

**Alternative Bekämpfungsmöglichkeiten des  
Fußfäuleerregers *Corticium rolfsii* Sacc.**

**Diego Falconi**

Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Alternative Bekämpfungsmöglichkeiten des  
Fußfäuleerregers *Corticium rolfsii* Sacc.**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften  
am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und  
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von  
**Diego Falconi**  
Geboren in Riobamba, Ecuador

Gießen 2001

**Prüfungskommission:**

<b>Vorsitzender:</b>	<b>Prof. Dr. V. DZAPO</b>
<b>1. Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. h.c. E. SCHLÖSSER</b>
<b>2. Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. h.c. W. FRIEDT</b>
<b>Prüfer:</b>	<b>Prof. Dr. S. SCHNELL</b>
<b>Prüfer:</b>	<b>Prof. Dr. R. MARQUARD</b>

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2001

*Meiner Frau*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>V</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung und Nutzung von <i>Trichoderma</i> spp.	2
1.2	Die biologische Bekämpfung pflanzenpathogener Pilze mittels <i>Trichoderma</i>	3
1.3	Antagonistische Mechanismen von <i>Trichoderma</i> spp.	3
1.3.1	Antibiosis	4
1.3.2	Mykoparasitismus	4
1.3.3	Konkurrenz	5
1.4	Enzyme von <i>Trichoderma</i> spp.	6
1.4.1	Glucanasen	7
1.4.2	Chitinasen	7
1.5	Taxonomie	9
1.6	Die Zellwand: Barriere von Pflanzen und Pilzen	11
1.6.1	Chitin	12
1.6.2	Cellulose	12
1.7	<i>Trichoderma</i> spp. als Induktor der Pflanzenresistenz	12
1.8	BION als Elicitor der Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR)	13
1.9	Systemisch Aktivierte Resistenz (SAR)	14
1.9.1	PR-Proteine	15
1.10	Ziele der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	Pilze	18
2.1.2	Versuchspflanzen	19
2.1.3	Nährmedien	19
2.1.4	Fungizide	20
2.1.5	Resistenzinduktor	22

2.1.6	Boden	23
2.1.7	Geräte	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Bestimmung der Wachstumsraten	23
2.2.2	Fungizidempfindlichkeit	23
2.2.3	Antagonismus von <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	24
2.2.4	Inokulumgewinnung von <i>Trichoderma</i> spp.	26
2.2.5	Inokulumträger von <i>Trichoderma</i> spp.	27
2.2.6	Anwendungsverfahren von <i>Trichoderma</i> spp.	28
2.2.7	Inokulumgewinnung von <i>C. rolfii</i>	28
2.2.8	Topfversuche	28
2.2.9	Rasterelektronenmikroskop	30
2.2.10	Induzierte Resistenz	31
2.2.11	Anlage der Topfversuche	33
2.2.12	Statistische Auswertung	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
3.1	Wachstum von <i>Corticium rolfii</i> <i>in vitro</i>	34
3.2	Wachstum und Sporulation von <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	35
3.3	Fungizidempfindlichkeit	38
3.4	Antagonismus von <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	48
3.4.1	Dualkultur	48
3.4.2	Antagonismus von <i>Trichoderma</i> spp. unter dem Rasterelektronen-mikroskop	51
3.4.3	Wachstumshemmung - volatile Stoffe von <i>Trichoderma</i>	53
3.4.4	Antagonismus von <i>Trichoderma</i> spp. gegen Sklerotien von <i>C. rolfii</i>	58
3.5	Gewächshausversuche	60
3.5.1	Wirkung der Inokulummenge von <i>T. harzianum</i> (HT-040) bei Bohnen- und Kichererbsen	60
3.5.2	Pathogenitätstest von <i>C. rolfii</i>	61
3.5.3	Anwendungsverfahren von <i>Trichoderma</i> spp.	66
3.5.4	Wirksamkeit einiger <i>Trichoderma</i> -Arten gegen <i>C. rolfii</i>	75

3.6	Induzierbare Resistenz	77
3.6.1	Phytotoxizität von BION <sup>®</sup> WG 50 bei Pflanzen	77
3.6.2	Untersuchung der Phytotoxizität von BION <sup>®</sup> 100 EC bei Pflanzen	81
3.6.3	Induzierte Resistenz gegen <i>C. rolfii</i>	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>90</b>
4.1	Wachstum von <i>C. rolfii</i> auf verschiedenen Nährmedien	91
4.2	Wachstum von <i>Trichoderma</i> spp.	91
4.3	Fungizidempfindlichkeit	92
4.4	Antagonismus von <i>Trichoderma</i> gegen <i>C. rolfii</i>	93
4.4.1	Parasitierung von Sklerotien	95
4.5	Gewächshausversuche	97
4.5.1	Hirsekörner als Inokulumträger von <i>Trichoderma</i>	97
4.5.2	Bodeneigenschaften	99
4.5.3	Sklerotien und Hirsekörner – Inokulum von <i>C. rolfii</i>	100
4.5.4	Bodenbehandlung mit Konidiensuspensionen aus PDA-Medium	100
4.5.5	Saatgutbeizung mit Konidiensuspensionen aus Hirse-Medium	102
4.5.6	Saatgutbehandlung mit Konidiensuspensionen aus PDA- und Hirsemedium und Gel-Alginat	103
4.5.7	Applikationszeit und Konzentration des Inokulums	104
4.5.8	Antagonistischer Mechanismus von <i>Trichoderma</i>	105
4.6	Kosten der Konidienproduktion	105
4.6.1	Lagerungsbedingungen	106
4.6.2	Zugelassene Präparate	106
4.7	Induzierte Resistenz durch <i>Trichoderma</i>	106
4.8	Systemisch Aktivierte Resistenz durch Bion <sup>®</sup>	108
4.8.1	Phytotoxische Wirkung von BION <sup>®</sup> WG 50 und BION <sup>®</sup> 100 EC	109
4.8.2	Versuche zur Induzierten Resistenz gegen <i>C. rolfii</i>	110

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>151</b>



## VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
a.i	aktive Substanz
BTH	Benzothiadiazol
Cr	<i>Corticium rolfii</i>
EC	emulgierbares Konzentrat
ED25, ED50, ED75-Werte	prozentige Hemmung einer Fungizidkonzentration
g	Gramm
h	Stunde
ha	Hektar
HCr	Hirsekörner (künstliches Inokulum von <i>C. rolfii</i> )
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
PGRP	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
PR-Proteine	Pathogenesis related-Proteins
rpm	Rotationen pro Minute
SA	Salicylsäure
SAR	Systemisch Aktivierte Resistenz
SIR	Systemisch Induzierte Resistenz
Skl	Sklerotien (natürliches Inokulum von <i>C. rolfii</i> )
spp.	Spezies
Tab	Tabelle
TMV	Tabak Mosaic Virus
WG	wasserdispergierbares Granulat

## 1 EINLEITUNG

Die Hauptverursacher sehr vieler Pflanzenkrankheiten sind Pilze. Einige von ihnen sind nicht nur extrem schädlich, sondern stellen überdies hemmende Faktoren beim Kulturanbau in bestimmten Gebieten dar (KRANZ et al., 1982; PUNJA, 1985). In den tropischen und subtropischen Regionen spielen insbesondere Temperatur und hohe Luftfeuchtigkeit eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Auftretens und der Verbreitung phytopathogener Pilze (AYCOCK, 1966).

Die Bohne (*Phaseolus vulgaris*) gilt als wichtiger Wirt für die Fäuleerreger *Corticium rolfsii* (CIAT, 1981) und *Sclerotinia sclerotiorum* (SCHLÖSSER, 1983). Es ist bekannt, daß die Zahl der Wirte sowohl für *C. rolfsii* als auch für *S. sclerotiorum*, insgesamt zwischen 200 und 300 Kulturpflanzenarten liegt (BACKMAN & PORTER, 1990; HALL & STEADMAN, 1991).

*Corticium rolfsii* (Hymenomycetes) verursacht Sämlings- und Umfallkrankheiten an Keimlingen (KRANZ et al., 1982) und ist häufig ein hemmender Faktor bei der Produktion von *P. vulgaris* (SUMMER, 1991), *Daucus carota*, (PUNJA et al., 1986), *Lycopersicum esculentum* (WELLS et al., 1971; ZEIDAN, 1985; MCCARTER, 1993) und *Glycine max* (SHEW et al. 1984; GAZAWAY & HAGAN, 1989). *C. rolfsii* verursacht Fußfäule und greift den Stengel von Jungpflanzen an (SIDDARAMAIAH et al., 1979; BACKMAN & PORTER, 1990; WEBSTER, 1993). Am Stengel entsteht über Bodenhöhe zunächst ein weißfarbendes Myzel, später bilden sich kugelförmige Sklerotien von brauner Farbe mit einem Durchmesser zwischen 0.5 - 2 mm (BRANCH, 1987; BACKMAN & PORTER, 1990). Sie überleben einige Jahre im Boden (PUNJA, 1988).

Die Hyphen von *C. rolfsii* sind septiert, hyalin und zwischen 5 - 9 µm breit (SUMMER, 1991; WEBSTER, 1983). Das Wachstum des Myzels und die Produktion von Sklerotien hängen von der Temperatur, der Bodenart sowie den Luft- und Lichtverhältnissen ab (PUNJA, 1985). *C. rolfsii* gilt als Produzent von Oxalsäure, die sich wie ein Phytotoxin verhält und im Laubwerk von *Arachis hypogea* gleichermaßen Chlorosen und Nekrosen hervorruft (BACKMAN & PORTER, 1990). SHEW et al. (1984) und PUNJA et al. (1984) stimmen darin überein, daß volatile Substanzen, die durch Pflanzengewebe von *A. hypogea* ausgeströmt werden, sowie hohe Luftfeuchtigkeit die Sklerotienbildung und die Infektion durch den Pathogen begünstigen. SUMMER (1991) stellt fest, daß die Oxalsäure sowie verschiedene Enzyme, die von *C. rolfsii* produziert werden, zum Absterben von *P. vulgaris* führen.

In den tropischen Regionen Südamerikas beeinträchtigt *C. rolfsii* vor allem die Samenproduktion von *P. vulgaris* und *G. max* (OERKE et al., 1994). Die Verbreitung der Pathogene erfolgt normalerweise durch Bewässerung, die als Myzel und Sklerotien transportiert werden und andere Pflanzen befallen (HALL & STEADMAN, 1991). Sklerotien sind hart, braun, rund und haben bis zu 2,5 mm Durchmesser (GRAU, 1989). In dieser Form überleben sie einige Jahre im Boden, überstehen größere Temperaturschwankungen und sind gegenüber Fungiziden resistent (SCHLÖSSER, 1983; GRAU, 1989).

Niedrige Mengen des Inokulums von *C. rolfsii* können einen höheren Prozentsatz einer Mortalität bei Pflanzen verursachen, weil der Pathogen sich zwischen den Pflanzen ausbreitet (PUNJA, 1985). *C. rolfsii* kann unter günstigen Bedingungen Produktionsverluste von 10 – 25% bei *P. vulgaris* und bis zu 80 % bei *A. hypogea* verursachen. Die von *S. sclerotiorum* bei *P. vulgaris* verursachten Verluste können sogar bis zu 100 % betragen, wenn der Befall sehr stark ist (SUMMER, 1991). Im Kulturanbau sind Schäden von über 5 %, die durch *C. rolfsii* verursacht worden sind, für die Ernte unannehmbar (PUNJA, 1985).

Die von *C. rolfii* und vielen anderen Krankheiten weltweit verursachten Schäden im Kulturanbau sind so groß, daß verschiedene Bekämpfungsmethoden, hauptsächlich auf der Basis chemischer Produkte, notwendig wurden (WEBSTER, 1983; MINTON et al., 1990). Die Anwendung von Fungiziden bei Zuckerrüben (AGNIHOTRI et al., 1975), Erdnuß (DIOMANDE et al., 1977) und Möhren (GURKIN & JENKINS, 1985) brachte unterschiedliche Ergebnisse bei der Bekämpfung von *C. rolfii*. Zahlreiche Fungizide, wie z.B. Benomyl (BACKMAN, 1990), Carboxin, Furmecycloz, PCNB, Chlorotalonil, Chlorpirifos (PUNJA et al., 1986), sowie die Begasung des Bodens mit Methylbromid, Chlorpikrin oder Metam sind in einigen Untersuchungen getestet worden (PUNJA, 1985).

Bei der Entwicklung alternativer Bekämpfungsverfahren gegen *C. rolfii* spielen ökonomische Überlegungen eine große Rolle. Der Einsatz chemischer Bekämpfungsmittel – Fumiganten und Fungizide – verursacht hohe Kosten. Je nach Typ der angebauten Kulturpflanzen kann dies dazu führen, daß der betreffende Kulturanbau ökonomisch nicht mehr rentabel ist (GURKIN & JENKINS, 1985).

Die Fungizide wirken zwar toxisch auf pathogene Pilze, verringern jedoch gleichzeitig in beträchtlichem Maße die Populationen antagonistischer Bodenorganismen. Darüberhinaus hat die Verwendung verschiedener Wirkstoffe wegen ihrer Toxizität Umweltprobleme hervorgerufen. Außerdem sind viele pathogene Pilze gegen die Fungizide resistent geworden.

In diesem Zusammenhang wurden bereits verschiedene Untersuchungen zur biologischen Kontrolle, basierend auf der Verwendung antagonistischer Pilze, durchgeführt. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei *Trichoderma* spp. als wichtigem Antagonisten bodenbürtiger Pathogene gewidmet (PAPAVIZAS & LUMSDEN, 1980). Deren antagonistischer Effekt wirkt sich auch bei der Bekämpfung verschiedener Blattkrankheiten und bei Holzfäule aus (NELSON & POWELSON, 1988; BETTUCCI et al., 1988).

### **1.1 Bedeutung und Nutzung von *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma*-Arten sind gewöhnliche saprophytische Pilze der Rhizosphäre und haben eine beträchtliche Aufmerksamkeit als ein potenzielles Mittel zur biologischen Bekämpfung zahlreicher bodenbürtiger Pilze erhalten (MARSCHALL, 1982; D'ERCOLE, SPORTELLI, NIPOTI, 1984; CHET, 1987; SAMUELS, 1996)

*Trichoderma*-Arten sind einfach zu isolieren, zu kultivieren und wachsen sehr schnell. Sie befallen selten Pflanzen und konkurrieren mit anderen Mikroorganismen um Nahrung und Raum. Sie haben ein Enzym-System, mit dessen Hilfe sie zahlreiche Pathogene befallen können (MONTES, Universidad de Salamanca, 1998, pers. Mitteilung). Die meisten Arten produzieren eine große Zahl von Konidien. Die Konidiophoren sind verzweigt mit eiförmigen bzw. runden Konidien. Die Chlamydosporen sind resistent gegenüber ungünstigen Bedingungen, was für das Überleben des Pilzes sehr wichtig ist (LEWIS & PAPAVIZAS, 1984).

Durch seine Fähigkeit, Cellulasen zu produzieren, kann *Trichoderma* industriell genutzt werden (KUBICEK, 1992). Mit Hilfe solcher Enzyme kann Cellulose in Glucose oder in Äthanol umgewandelt werden, die normalerweise durch chemische Prozesse hergestellt werden (KUHL, 1997). Die Cellulasen von *Trichoderma reesei* sind in der Lage, recyceltes Papier zu weißen. Sie werden u.a. in der Textilindustrie als Bleichmittel verwendet und sind damit eine umweltfreundliche Alternative zum üblicherweise verwendeten Chlor (BUCHERT et al., 1994). Neben diesen Anwendungen sind sie auch bedeutsam beim Abbau von Rückstandsprodukten, die bei der Zuckergewinnung aus Zuckerrüben entstehen, und deren Umwandlung in Proteine, die als Futtermittel verwendet werden können (NIGAM, 1994, zitiert in KUHL, 1997; HERMOSA, 1998).

## 1.2 Die biologische Bekämpfung pflanzenpathogener Pilze mittels *Trichoderma*

In den letzten Jahren wurden in der Landwirtschaft einige mykoparasitische Pilze, wie *Trichoderma* spp., für die Bekämpfung von Pflanzenpathogenen als biologisches Mittel und als Alternative zu chemischen Produkten eingesetzt (PAPAVIZAS, 1985; CHET, 1987; CAMPBELL, 1989; YEDIDIA et al., 1998; LORITO et al., 1998). Zu diesem Zweck wurden Hyphen, Chlamydosporen und Konidien von *Trichoderma* produziert und als "Bioprotector" gegen verschiedene Pflanzenkrankheiten eingesetzt (PAPAVIZAS, 1985; HARNAN et al., 1991). Versuche zur biologischen Bekämpfung von *S. sclerotiorum* wurden u.a. von LEE & WU (1986) durchgeführt. NIPOTI, SPORTELLI und D'ERCOLE (1983) bekämpften *Sclerotinia minor*; WELLS et al. (1971); HENIS & PAPAVIZAS (1983) *Sclerotium rolfsii*; HADAR et al. (1984) *Pythium* spp.; STRASHNOV et al. (1985) und KÖHL (1989) *Rhizoctonia solani*; KÖHL & SCHLÖSSER (1988) und ELAD et al. (1993) *Botrytis cinerea*.

Einige *Trichoderma*-Stämme sind gegen *S. rolfsii* besonders wirksam. Um nur einige Beispiele einer Reihe von wichtigen Untersuchungen, die in diesem Bereich durchgeführt worden sind, zu nennen, haben Stämme von *Trichoderma* u.a. gegen *R. solani*, *Phytophthora cactorum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* (WEBER, 1993; CHET & INBAR, 1994); *Phoma betae* (GRONDONA, et al., 1992); *Pythium debaryanum*, *Fusarium solani* (ABADA, 1994); *B. cinerea* in Tomate (ELAD et al., 1995; O'NEIL et al., 1996) *Sclerotinia sclerotiorum* (KNUDSEN & ESCHEN, 1991) und *Sclerotinia minor* in Eisbergsalat ihre Wirkung gezeigt (VANNACI et al., 1991).

Biologische Bekämpfung ist mit verschiedenen Zielen und mit verschiedenen Mikroorganismen weltweit durchgeführt und dokumentiert worden (BUCHENAUER, 1998). *Trichoderma* spp. gilt dabei zunehmend als Mittel, das das Auftreten von Krankheiten verhüten oder den durch pflanzliche Pathogene verursachten Schaden verhindern kann. In den meisten Fällen wird der saprophytische Pilz *Trichoderma* spp. in kommerziellen Präparaten wie z.B. *T. harzianum* (T39) als Trichodex<sup>TM</sup> (ELAD & SHTIENBERG, 1996), für eine biologische Kontrolle, eingesetzt. Das Produkt Binab-T<sup>TM</sup> besteht aus einer Mischung von *T. harzianum* und *T. polysporum*. GlioGard enthält *T. virens* und wird bei der Bekämpfung von *Pythium* und *Rhizoctonia* benutzt (LUMSDEN & LOCKE, 1989), während *T. harzianum* (T-22) gegen *Fusarium*, *Rhizoctonia* und *Pythium* in verschiedenen Kulturen wirkt (HAYES et al., 1997). Die Formulierungen von *Trichoderma* spp. können als Samenbeizung verwendet oder im Boden eingepflügt werden (COOK, 1997). In zahlreichen Untersuchungen wurde bewiesen, daß *Trichoderma* nicht nur die Pflanzen vor den Pathogenen schützt, sondern auch einen Wachstumsschub in der Pflanze induziert, vergleichbar der Wirkung von PGPR, das sind Rhizobakterien, die das Wurzelsystem besiedeln und ein Pflanzenwachstum induzieren und gleichzeitig verschiedene Pflanzenkrankheiten kontrollieren (BAKER, 1989; KLEIFELD & CHET, 1992; BUCHENAUER, 1998; KOCH et al., 1998). In einigen Untersuchungen wurde außerdem nachgewiesen, daß *Trichoderma* eine natürliche Resistenz gegen den Angriff pilzlicher Pathogene induziert (MEYER et al., 1998).

## 1.3 Antagonistische Mechanismen von *Trichoderma* spp.

Die antagonistischen Mechanismen von *Trichoderma* spp. sind in zahlreichen Untersuchungen diskutiert worden (DENNIS & WEBSTER, 1971a; PERSSON et al., 1985; LEWIS & PAPAVIZAS, 1987a; GHISALBERTI & SIVASITHAMPARAM, 1991; HARMAN et al., 1993; SVAN & CHET, 1993; HARAN et al., 1996). Sie lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Produktion antibiotischer, volatiler und nicht-volatiler Toxine
- Parasitierung von Hyphen anderer Pilze mit Hilfe verschiedener Enzyme
- Starke Nahrungskonkurrenz in der Rhizosphäre mit anderen Pilzen während der saprophytischen Phase.

### 1.3.1 Antibiosis

Die antibiotische Aktivität von *Trichoderma* spp. wurde durch WEINDLING (1934, zitiert in HERMOSA, 1998), und durch DENNIS & WEBSTER (1971 a,b) nachgewiesen. Seitdem sind zahlreiche antibiotische Substanzen beschrieben worden, die auf die Permeabilität der cytoplasmatischen Membran wirken (JONES & HANCOCK, 1988). Die von *Trichoderma* spp. produzierten toxischen Metabolite und andere Substanzen verhindern die Keimung der Sporen sowie das Wachstum und die Entwicklung vieler pathogener Pilze. Diese Substanzen schädigen die Wirtszellmembran und verursachen dadurch einen Efflux von Zellinhaltsstoffen, wie Kohlenhydrate, Proteine, Aminosäuren und Salze. Da die Wirkung dieser Substanzen durch Hitzebehandlung nur z.T. reduziert wird, handelt es sich wahrscheinlich um hitzestabile Toxine (SHAHIDI & SCHLÖSSER, 1983).

Zu den bekanntesten Substanzen zählen Trichodermin (GODTFREDSEN & VANGEDAL, 1965, zitiert in KÖHL, 1989), Gliotoxin und Viridin (DENNIS & WEBSTER, 1971b), sowie Dermatin (MEYER, 1966). Neue Substanzen wie Isonitril (OKUDA et al., 1982), Trichokonin aus *T. koningii* (HUANG et al., 1995), Tricholin aus *T. viride* (LIN et al., 1994) wurden isoliert und charakterisiert. Das am häufigsten aus *Trichoderma* hergestellte Antibiotikum ist Acetaldehyd (DENNIS & WEBSTER, 1971 a,b).

Der antibiotische Mechanismus ist besonders wirksam bei der Bekämpfung von *Botrytis cinerea* durch *T. hamatum*, was NELSON & POWELSON (1988) nachgewiesen haben. Der Metabolit 6-pentil-Pirone von *T. harzianum* hemmt das Wachstum von *R. solani* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *in vitro* (FAULL & SCARSELETTI, 1994); Gliotoxin, ein Metabolit von *T. virens* G-20, der unter dem Namen GLIOGARD<sup>®</sup> gehandelt wird, wird bei der Bekämpfung von Keimlingskrankheiten, verursacht durch bodenbürtige Pilze, eingesetzt (WHILHITE et al., 1994).

Verschiedene Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß einige Substanzen von *Trichoderma* spp., wie Peptide, das Wachstum des Myzels verhindern und Zoosporen von *Phytophthora cactorum* lysieren (LEDERER et al., 1992). Gleichermäßen produzierten durch UV-Behandlung mutierte Formen von *Trichoderma* spp. zu zwei neuen, noch nicht identifizierten Metaboliten, von denen nur einer hitzestabil ist (PAPAVIZAS et al., 1982).

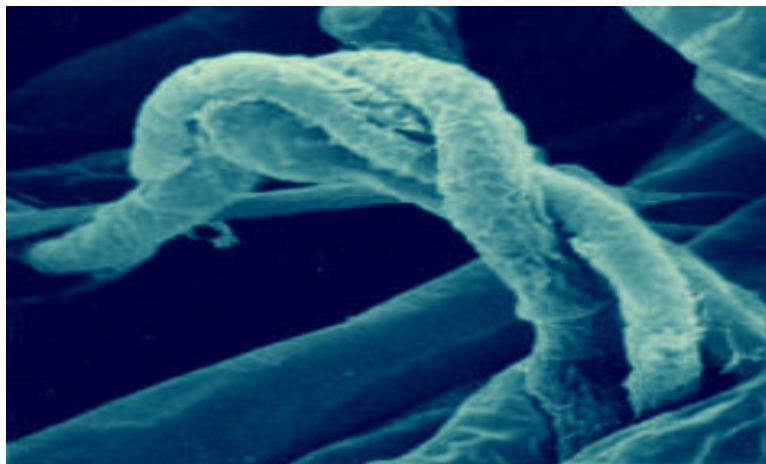
### 1.3.2 Mykoparasitismus

Der Mykoparasitismus von *Trichoderma* spp. auf *Rhizoctonia solani* wurde zum ersten Mal durch WEINDLING (1932, zitiert in HERMOSA, 1998) nachgewiesen und von KÖHL (1989) bearbeitet. Die gewöhnliche Form des Parasitismus von *Trichoderma*-Hyphen auf anderen Pilzen tritt in Form einer Umwindung (DENNIS & WEBSTER, 1971c) auf, dem sog. coiling (PERSSON et al., 1985), wie in Abb. 1 gezeigt. Bei Kontakt mit dem Wirt baut *Trichoderma* die Zellwand des Pathogens mittels hydrolytischer Enzyme ab (ELAD et al., 1982; CHET et al., 1998).

Im Prozeß des Mykoparasitismus von *Trichoderma* spielt für das Auffinden und Erkennen des Wirtes die Wechselwirkung zwischen den Lectinen des Pilzes und den Resten von Galactosen der Zellwand von *Trichoderma* eine Rolle (INBAR & CHET, 1997). Die Haftung zwischen

Antagonist und Pathogen entsteht durch die Bildung appressorienähnlicher Strukturen, die sich fest an die Oberfläche des Wirtes klammern (PERSSON et al., 1985). Dann setzt das Eindringen von *Trichoderma*-Hyphen in das Innere des Myzels des Pilzes ein, wie es z.B. bei *R. solani* und *Sclerotium rolfsii* durch ELAD et al. (1983) gezeigt wurde. Anschließend erfolgt die Verdauung von Zellinhaltsstoffen, erkennbar an morphologischen Veränderungen wie Vakuolisierung, Efflux des Cytoplasmas und Abbau der Wirtshyphen (ELAD et al., 1983; DEB & DUTTA, 1990; BENHAMOU & CHET, 1996).

Dieser Prozess läuft vermutlich durch die Freisetzung toxischer Substanzen und durch die Ausscheidung membranlysierender Enzyme, wie Phospholipasen, Proteasen und Lipasen, ab (LEWIS & PAPAVIDAS, 1987a). Die Produktion zellwandauflösender Enzyme, wie  $\beta$ -1,3 Glucanasen, Chitinasen und Cellulasen, von *T. harzianum*, und *T. hamatum* wurden von FANELLI & CERVONE (1977); ELAD et al. (1982; 1983; 1984); LORITO et al. (1993); LORITO et al. (1996) und CHET et al. (1998) nachgewiesen. Diese Enzyme verursachen die Auflösung der Zellwände von *Rhizoctonia solani* (MANZALI et al., 1993). Die Beteiligung des Enzyms  $\beta$ -1,3 Glucanase bei der Parasitierung der Sklerotien von *S. rolfsii* wurde von ELAD et al. (1984) gezeigt. Der Abbau der Zellwände von *S. sclerotiorum* wurde von ARTIGUES & DAVET (1984) nachgewiesen. Gleichermäßen konnten ELAD et al. (1983) zeigen, daß die Hemmung dieses Enzyms keine weitere Parasitierung des Wirtes mit sich brachte.



**Abb. 1** Umwindung (coiling) von *Trichoderma* spp. um Hyphen von *C. rolfsii* (1900fach vergrößert)

### 1.3.3 Konkurrenz

*Trichoderma* kommt weltweit im Boden vor. Dies beweist, daß *Trichoderma* spp. im Wettbewerb um Nährstoffe und Raum stark sind (HERMOSA, 1998). Der Pilz bevorzugt Böden mit einem hohen Gehalt an organischem Material (BISSET, 1991a). Er zerlegt die Grünmasse, findet sich auf der Oberfläche von Pflanzenwurzeln und auf Strukturen anderer Pilze, z.B. der Sklerotien. *Trichoderma*-Arten sind weltweit in verschiedenen Klimazonen verbreitet und werden von anderen Organismen in ihrer konkurrierenden Aktivität beeinflusst (MONTES, Universidad de Salamanca, 1998, pers. Mitteilung). Während einige Arten von *T. hamatum* und *T. pseudokoningii* feuchtem Boden angepasst sind, kommen *T. viride* und *T. polysporum* überwiegend in Zonen mit niedrigen Temperaturen vor. *T. harzianum* und *T. koningii* finden sich dagegen in unterschiedlichen Klimazonen (WARDLE et al., 1993).

Die Fähigkeit von *Trichoderma* spp. zur Nahrungskonkurrenz während der saprophytischen Phase des Pathogens und zur Unterdrückung ihres Wachstums hängt stark vom Verhältnis zwischen den verschiedenen *Trichoderma*-Arten, dem Boden und dem Pathogen ab. Zahlreiche Untersuchungen im Feld, im Gewächshaus und im Labor zeigen verschiedene Ergebnisse und Wirkungen des antagonistischen Pilzes bei der Bekämpfung von Pflanzenpathogenen.

Mittels des Konkurrenzmechanismus kontrolliert *T. harzianum* *B. cinerea* im Weinbau (DUBOS et al., 1982), *R. solani* und *Pythium graminicola* an Grasanbau (LO, 1996). Nach der Meinung von AHMAD & BAKER (1988) sind einige mutierte *Trichoderma* spp. Überproduktoren von Cellulasen, die eine bessere saprophytische Konkurrenzfähigkeit in der Rhizosphäre haben. Nach Auffassung von KÖHL & SCHLÖSSER (1991) und MELO (1997) besiedeln *Trichoderma*-Arten, die wenig Cellulasen produzieren, vorwiegend die Rhizosphäre. Nach PAPAIVIZAS (1985) hängt die Wettbewerbsfähigkeit von *Trichoderma* um Nahrung und Raum und sein Erfolg bei der biologischen Bekämpfung von den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens, der Temperatur, der Feuchtigkeit und des pH-Wertes des Bodens ab. Die antagonistische Fähigkeit von *Trichoderma* im Boden wird neben diesen Faktoren auch durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln beeinflusst. Sie können die infektiösen Einheiten von *Trichoderma* verringern, nachdem der Pilz als Mittel zur biologischen Bekämpfung eingeführt worden ist (PAPAIVIZAS, 1985). Dies bedeutet, daß die *Trichoderma*-Arten mit den jeweils eingesetzten chemischen Produkten kompatibel sein müssen, wenn eine optimale Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten erreicht werden soll.

Die bisher unter Verwendung von *Trichoderma* spp. durchgeführten biologischen Bekämpfungsversuche umfassen weltweit ein großes Spektrum von Pathogenen auf unterschiedlichsten Kultursubstraten. Die antagonistischen Fähigkeiten wurden durch Anwendung von Konidien im Boden oder auf Samen, durch die Produktion von Fermenterbiomasse oder durch Verwendung von *Trichoderma*-Pellets getestet (KÖHL, 1989). Präparate von *Trichoderma harzianum* (Trichodex) sind unter kommerziellen Bedingungen an Gurkenkulturen im Gewächshaus angewandt worden (ELAD et al., 1993). *Trichoderma*- und *Gliocladium*-Isolate waren wirksam bei der Bekämpfung von *B. cinerea* an Trauben (GULLINO & GARIBALDI, 1988, zitiert in ELAD et al., 1993) und an Erdbeeren (PENG & SUTTON, 1990). Auch sind sie in Kombination mit Fungiziden wie Vinclozolin, Metalaxyl und Captan in niedriger Dosis zur Krankheitsbekämpfung getestet worden (MC CAIN et al., 1985, zitiert in ELAD et al., 1993). Die Kombination von *Trichoderma* mit Iprodione oder Vinclozolin ergab einen hohen Wirkungsgrad bei der Bekämpfung des Grauschimmels an Gurkenkulturen. Der Wirkungsgrad unterschied sich jedoch nicht von dem bei alleiniger Verwendung von *Trichoderma* oder von Fungiziden (ELAD et al., 1993). Einige *Trichoderma*-Arten sind mit Thiram verträglich und wurden gegen *Pythium* benutzt (RICHARDSON, 1954, zitiert in HERMOSA, 1998). Andere Produkte wie Metalaxyl, Captan und Vinclozolin hemmen das Wachstum von *Trichoderma* nicht und können in einer integrierten Krankheitsbekämpfung verwendet werden. Die durch UV-Licht mutierten Isolate von *Trichoderma* konnten aufgrund ihrer Toleranz gegen hohe Konzentrationen von Benomyl und durch ihre zunehmend antagonistische Fähigkeit gegen *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii* und *Pythium ultimum* selektiert werden (PAPAIVIZAS & LEWIS, 1983).

#### 1.4 Enzyme von *Trichoderma* spp.

Zu den bedeutendsten Eigenschaften von *Trichoderma* zählt die Produktion von Enzymen, die bei der Erkennung, Bindung und Zerstörung der Wirtszellwand auftreten. Das antimykotische Enzym-System von *Trichoderma* beruht auf mehreren Genen, die zahlreiche Enzyme kodifizieren, unter anderem: Endochitinasen,  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidasen, Chitin- $\beta$ -1-4-

Chitobiosidasen, Proteasen,  $\beta$ -1,3-Glucanasen,  $\beta$ -1,4-Glucanasen,  $\beta$ -1,6-Glucanasen, Lipasen, Xylanasen, Mananasen, Pectinasen, Phospholipasen, RNasen, DNasen und Amilasen (LORITO et al., 1998). Das Cellulase-Enzym-System von *T. reesei* besteht aus drei Gruppen: 1,4- $\beta$ -Glucan Cellobiohydrolasen (CBH), Endo-1,4- $\beta$ -D-Glucanasen (EG) und 1,4- $\beta$ -D-Glucosidasen. Von besonderer Bedeutung sind Glucanasen und Chitinasen, die Glucane und Chitin der Zellwand phytopathogener Pilze abbauen können (HARAN et al., 1993; CHET, 1998).

### 1.4.1 Glucanasen

$\beta$ -Glucane sind Homopolymere von D-Glucose, die durch  $\beta$ -Bindungen miteinander verknüpft sind. Von den Mikroorganismen sind Pilze die wichtigsten Produzenten von  $\beta$ -Glucanasen, die  $\beta$ -Glucane abbauen können (REESE & MANDELS, zitiert in HERMOSA, 1988). Enzyme, die  $\beta$ -Glucane hydrolysieren, werden je nach dem Typ der  $\beta$ -glucosidischen Bindung, die sie aufbrechen, klassifiziert. Es gibt verschiedene Gruppen von Enzymen:  $\beta$ -1,3-Glucanasen,  $\beta$ -1,6-Glucanasen,  $\beta$ -1,4-Glucanasen oder Cellulasen, die das  $\beta$ -1,4-Glucan (den wichtigsten Homopolymer der Natur) abbauen.

#### $\beta$ -1,3-Glucanasen

$\beta$ -1,3-Glucanasen hydrolysieren  $\beta$ -1,3-glycosidisch gebundene Glucose-Polymere.  $\beta$ -1,3-Glucanasen oder  $\beta$ -1,3-Glucanhydrolasen können entweder Endo- oder Exo- $\beta$ -1,3-Glucanasen sein. Die Endo- $\beta$ -1,3-Glucanasen wirken im Inneren der Moleküle und setzen Oligosaccharide frei. Exo- $\beta$ -1,3-Glucanasen setzen Glucoseeinheiten frei. Bei *T. harzianum* wurden sowohl Exo- als auch Endo- $\beta$ -1,3-Glucanasen nachgewiesen und charakterisiert (DUBOURDIEU et al., 1985; LORITO et al., 1994). LORITO et al. (1994) haben nachgewiesen, daß Glucane eine wichtige Rolle beim Parasitismus spielen. Mit 90  $\mu$ g/ml gereinigter  $\beta$ -1,3-Glucanase aus *T. harzianum* wurde die Konidienkeimung von *B. cinerea* gehemmt.

#### $\beta$ -1,4-Glucanasen

In *T. reesei* wurden mindestens drei verschiedene Endoglucanasen (EGI, EGII, und EGIII), zwei Cellobiohydrolasen (CBHI und CBHII) und einige Formen von  $\beta$ -Glucosidasen identifiziert (HERMOSA & MONTES, 1998, Universidad de Salamanca, Spanien, pers. Mitteilung). Verschiedene Gene von *T. reesei* (cbhl, cbh2) wurden durch TEERI et al. (1983), egl1 durch VAN ARSDELL et al. (1987), egl3 durch SALOHEIMO et al. (1988) und ein Gen der  $\beta$ -Glucosidase bgl1 durch BARNETT et al. (1991) kloniert und charakterisiert.

#### $\beta$ -1,6-Glucanasen

Bisher wurden erst zwei verschiedene Enzyme, die  $\beta$ -1,6-glucosidische Bindungen abzubauen vermögen, beschrieben (DE LA CRUZ et al., 1995; LARA et al., 1995): Endo  $\beta$ -1,6-Glucosidasen und  $\beta$ -Glucosidasen aus *T. harzianum*.

### 1.4.2 Chitinasen

Chitinase hydrolysiert Chitin, einen wichtigen Zellwandbaustein der meisten Pilze. Nach SAHAI & MANOCHA (1993) können Chitinasen in drei Gruppen eingeordnet werden:



## Chitobiose

Chitobiose, auch als  $\beta$ -1,4-N-Acetylglucosaminidase bekannt, hydrolisiert Chitobiose und Oligosaccharide von Chitin und Moleküle von N-Acetylglucosamin. HARAN et al. (1995) haben die Enzyme Chitobiase (CHIT102) von *T. harzianum* und (CHIT73) gereinigt und charakterisiert (LORITO et al., 1994).

## Endochitinasen

Endochitinasen setzen nach dem Angriff auf die Chitin-Moleküle Oligosaccharide frei. Vier Endochitinasen von *T. harzianum*- CHIT 33 (DE LA CRUZ et al., 1992; HARMAN et al., 1995); CHIT 42 (DE LA CRUZ et al. 1992); CHIT 52 (HARMAN et al., 1995) und CHIT 31 (HARMAN et al., 1995) sind gereinigt und charakterisiert worden. Zwei Gene, die für die Kodifikation von Endochitinasen verantwortlich sind, sind kloniert und charakterisiert worden. Chitinase-Enzyme sind in flüssigem Medium mit Chitin als einziger Kohlenquelle induziert worden. Sind *Trichoderma* spp. auf einem Glucose-Medium gewachsen, wurde in geringer Menge das Intrazellulär-Enzym CHIT 102 induziert (HARMAN et al., 1995). Die Ausprägung des Chitinase-Enzym-Systems von *Trichoderma* wird durch den Wirt beeinflusst. HARMAN et al. (1996) haben gezeigt, daß die enzymatische Aktivität von N-Acetylglucosaminidase CHIT 102 aus *T. harzianum* erst 12 Stunden nach dem Kontakt mit *C. rolfii* induziert wurde. Erst nach weiteren 12 Stunden nahm die Aktivität ab und N-Acetylglucosaminidase (CHIT 73) wurde aktiviert.

## Chitobiosidasen

Chitobiosidasen oder Exochitinasen setzen von den nicht reduzierenden Enden der Chitin-Dimeren N-Acetylglucosamin frei und sind als Chitobiose bekannt. Bei einigen Arten von *Trichoderma* wurde beobachtet, daß neben Chitinasen, Chitobiasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen auch Proteasen und Lipasen sekretiert wurden, wenn den Nährmedien Chitin, Laminarin oder Zellwandbestandteile anderer Pilze zugeführt wurde (ELAD et al., 1982; DE LA CRUZ, 1992). PAPAIVIZAS (1985) fand in einigen *Trichoderma*-Stämmen eine Korrelation zwischen der Bildung und Aktivität von Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen mit den Proteasen und Lipasen bei der lytischen Aktivität gegenüber den Zellwänden phytopathogener Pilze. Bei der Erkennung und der Spezifität der Wirte sind die auf den pathogenen Pilzen erkannten Lektine von Bedeutung (IMBAR & CHET, 1992; NEETHLING & NEVALEINEN, 1996). Der Synergismus zwischen den hydrolytischen Enzymen und Antibiotika wurde beim Parasitismus von *T. harzianum* durch LORITO (1993) und SCHIRMBÖCK et al. (1994) bewiesen. Die antimykotische Aktivität von Endochitinase und die Chitobiosidase hemmte die Keimung von Konidien und die Keimschlauchbildung einiger Chitin-Pilze (LORITO, 1993). Einen Synergismus und eine hemmende Wirkung zwischen der N-Acetylglucosaminidase und der 1,3- $\beta$ -Glucosidase sowie eine wirksame Kombination mit Fungiziden fand LORITO (1994) gegen *B. cinerea*. Die Nutzung des Synergismus einiger hydrolytischer Enzyme mit kommerziellen Fungiziden könnte eine strategische Methode bei einer integrierten Bekämpfung sein. So könnten die Fungizide in niedrigeren Mengen als bisher angewendet und trotzdem ihre Wirkung erhöht werden. Damit lassen sich die Selektion resistenter Mikroorganismen gegen chemische Produkte verhindern und Umweltschäden verringern.

## 1.5 Taxonomie

Obwohl *Trichoderma* spp der weltweit am häufigsten auftretende Pilz ist und entsprechend untersucht worden ist, wird seine Taxonomie noch diskutiert. (RIFAI, 1969; BISSETT, 1984; GAMS et al., 1987; BISSETT, 1991a, b).

Die Gattung *Trichoderma* gehört zur Familie der Moniliaceae (RIFAI, 1969), in der nur anamorphe Konidienstadien bekannt sind. Sie haben daher keine sexuelle Vermehrung bzw. bekanntes teleomorphes Stadium (GAMS et al., 1987). Der erste Bestimmungsschlüssel von *Trichoderma*-Arten wurde von (GILMAN & ABBOTT, 1927 zitiert in KUHLS, 1997) beschrieben. Er wurde bis 1939 benutzt. Danach wurde eine neue taxonomische Bestimmung für *Trichoderma* durch (BISBYS 1939, zitiert in HERMOSA, 1998) vorgenommen. Später untersuchten RIFAI & WEBSTER (1966) eine mögliche Verbindung zwischen der Ascomyceten-Gattung *Hypocrea* und deren Anamorphen mit *Trichoderma*-Arten. Ausgehend von morphologischen Kriterien konnte RIFAI (1969) die Gattung *Trichoderma* in neue Arten-Aggregate einordnen und bildete damit die bis heute gültige Grundlage der *Trichoderma*-Taxonomie: (1) *T. piluliferum* Rifai & Webster; (2) *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai; (3) *T. hamatum* (Bon.) Bain.; (4) *T. koningii* Oud.; (5) *T. aureoviride* Rifai; (6) *T. harzianum* Rifai; (7) *T. longibrachiatum* Rifai; (8) *T. pseudokoningii* Rifai; (9) *T. viride* Pers.ex :Fr.. Eine weitere Bearbeitung der *Trichoderma*-Taxonomie wurde durch BISSET (1991a) durchgeführt. BISSET (1991b) überprüfte die bisher bekannten Arten-Aggregate von *Trichoderma* spp. und die anamorphen Stadien von *Hypocrea* spp. und schlug fünf neue Sektionen für die Gattung *Trichoderma* vor, wie in Abb. 2 zu sehen ist: (1) TRICHODERMA (*T. koningii*; *T. aureoviride*, *T. viride*, *T. atroviride*); (2) PACHYBASIIUM (*T. hamatum*, *T. polysporum*, *T. piluliferum*); (3) SATURNISPORUM (*T. saturnisporum*); (4) LONGIBRACHIATUM (*T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum*); (5) HYPOCREARUM (anamorphe Stadien von *Hypocrea*). Die Unzulänglichkeit der morphologischen Methoden haben zu vielen Kontroversen bei der Identifikation der *Trichoderma*-Arten geführt. In vielen Fällen sind die Formen der Phialiden, der Verzweigungstyp der Konidiophoren (RIFAI, 1969), die gelbe Pigmentation - typisch für die Sektion Longibrachiatum (BISSET, 1991a) - oder die Art der Konidien nicht ausreichend gewesen, um einen phylogenetischen Zusammenhang zwischen den Arten zu bestimmen. Gerade die Ähnlichkeiten der Konidiophoren und der Phialiden und andere morphologische Eigenschaften zwischen den Arten haben es erschwert, eine deutliche taxonomische Differenzierung der *Trichoderma*-Arten vorzunehmen.

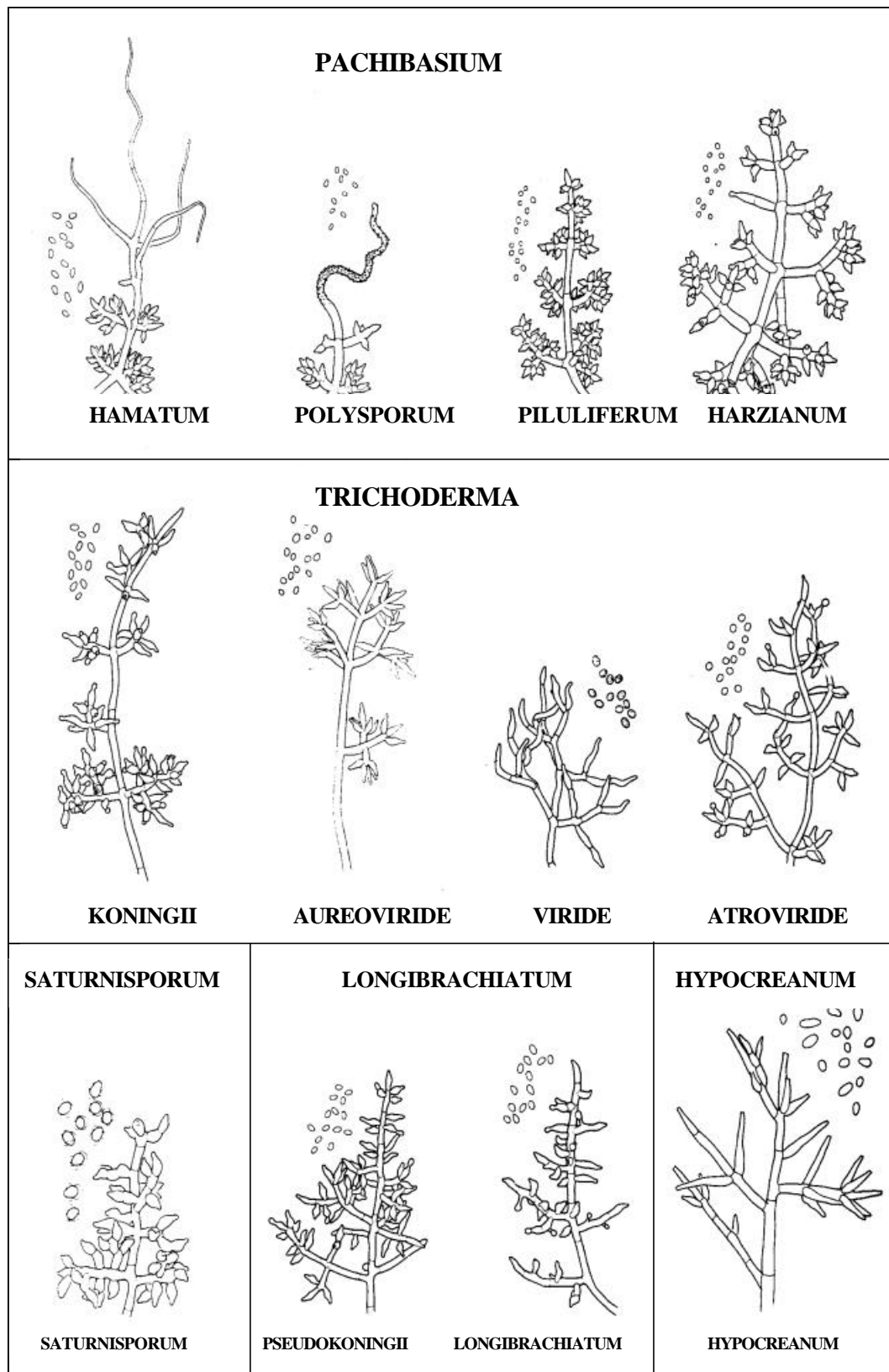


Abb. 2: Einteilung der Gattung *Trichoderma* in fünf Sektionen nach BISSET (1991a).

Inzwischen wurden in der Biochemie und der molekularen Biologie neue Methoden entwickelt, Enzyme und Nukleinsäuren verschiedener Arten-Aggregate und der beschriebenen Sektionen zu bestimmen. Zusammen mit den morphologischen Aspekten ergeben sich somit neue Möglichkeiten für eine zuverlässige Identifizierung der Arten.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie haben MEYER & PLASKOWITZ (1989) die Konidien verschiedener *T. viride* untersucht und konnten innerhalb dieser Art zwei Gruppen differenzieren. ZAMIR & CHET (1985) und SAMUELS et al. (1994) haben Isoenzymuntersuchungen durchgeführt. THORNTON et al. (1994) ist es gelungen, mit Hilfe einer Reihe von neu entwickelten Methoden einen phylogenetischen Zusammenhang zwischen den *Trichoderma*-Arten zu herzustellen.

Mittels DNA-Test haben MEYER et al. (1992) fünf Gruppen festgelegt: (I) *T. reesei*, *T. todicta*; (II) *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*; (III) *T. virgatum*; (IV) *T. saturnisporum* und (V) *T. harzianum*, wobei die Gruppen (I) und (II) Cellulasen-Enzyme produzieren. Diese Ergebnisse trennen *T. reesei* und *T. longibrachiatum* taxonomisch und stimmen mit den von MORAWETZ et al. (1992) durchgeführten Genrestriktions-Cellulasen und mit den Isoenzymuntersuchungen von SAMUELS et al. (1994) überein. Die Einordnung der *Trichoderma*-Arten von BISSET (1991b) aufgrund morphologischer Kriterien wird damit erneut in Frage gestellt (KUHLS et al., 1997).

## 1.6. Die Zellwand: Barriere von Pflanzen und Pilzen

Die Zellwand von Pflanzen und Pilzen ist die physikalische und chemische Barriere, die sie vor dem Angriff von Pathogenen schützt. Pilzzellwände setzen sich zusammen aus Kohlenhydraten, Proteinen, Lipiden, Pigmenten und mineralischen Salzen (ELSTNER et al., 1996; PEDERBY, 1990; SCHWANTES, 1996). Kohlenhydrate oder Saccharide sind essentielle Bestandteile aller lebenden Organismen und bilden die am häufigsten vorkommende Stoffklasse im biologischen Bereich (VOET & VOET, 1993). Hauptbestandteil der Kohlenhydrate ist die Cellulose (Abb. 3a) (HELDT, 1999). Fibrilläre Hauptpolysaccharide sind das Chitin (Abb. 3b) und die  $\beta$ -Glucane einschließlich der Cellulose (AGRIOS, 1997).

Die Zellwand einer Pflanze besteht zu etwa 90 % aus Kohlenhydraten und 10 % aus Proteinen. Während des Zellwachstums der ersten Wand setzt sie sich hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose, Pektin und Glycoproteinen zusammen. Das Pektin verleiht der Wand elastische Eigenschaften und bildet zusammen mit den Glykoproteinen und der Hemicellulose die Matrix für die Einbettung der Cellulosemikrofibrillen. Die sekundäre Wand besteht vorwiegend aus Cellulose. Die Einlagerung von Lignin in die Sekundärwand führt zu einer Verholzung der Zelle (ELSTNER et al., 1996; AGRIOS, 1997). Lignin, ein Phenol-Polymer (VOET & VOET, 1993), ist nach der Cellulose der zweithäufigste Naturstoff der Erde (HELDT, 1999).

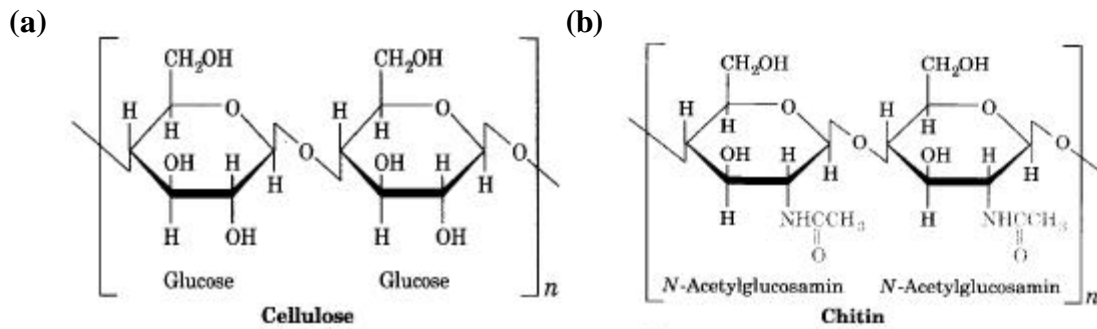


Abb. 3 Struktur von (a) Cellulose, ein  $\beta(1-4)$  Glucan und (b) Chitin, ein  $\beta(1-4)$  verknüpftes Homopolymer des N-Acetyl-D-Glucosamins, wichtiger Polysaccharide und Hauptbestandteile der Zellwände von Pflanzen und Pilzen (VOET & VOET, 1993)

### 1.6.1 Chitin

**Chitin ist das Strukturelement des Außenskeletts der Arthropoden und Insekten und ein wichtiger Zellwandbaustein vieler Pilze und Algen** (VOET & VOET, 1993; ELSTNER et al., 1996; SCHWANTES, 1996). Wie in Abb. 3b zu sehen ist, ist Chitin ein unverzweigtes Homopolymer von N-Acetyl-D-Glucosamin und in einer  $\beta(1-4)$ -Bindung verknüpft (VOET & VOET, 1993; SCHWANTES, 1996; NULTSCH, 1996). Im Unterschied zur Cellulose ist jede C(2)-Hydroxygruppe durch eine Acetamidfunktion ersetzt (VOET & VOET, 1993).

### 1.6.2 Cellulose

**Cellulose** ist ein lineares Polymer (ein  $\beta(1,4)$ -Glucan), d.h. ihre Makromoleküle sind aus D-Glucosemolekülen aufgebaut, die über  $\beta(1-4)$ -glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (Abb. 3a) (VOET & VOET, 1993; NULTSCH, 1996). Bei einigen Pilzen der Oomycota besteht die Zellwand hauptsächlich aus Glucanen, kleinen Mengen von Cellulose, aber nicht aus Chitin (ELSTNER et al., 1996; AGRIOS, 1997). Die  $\beta$ -glycosidischen Bindungen der Cellulose werden durch das Enzym Cellulase gelöst und zu Cellobiose abgebaut, die ihrerseits durch Cellobiase in Glucose überführt wird

## 1.7. *Trichoderma* spp. als Induktor der Pflanzenresistenz

Trotz zunehmender Forschungsaktivitäten über die antimikrobielle Aktivität von *Trichoderma in vitro*, gibt es noch immer keine genauen Erkenntnisse über die Mechanismen, die für die Verringerung des Krankheitsbefalls der mit *Trichoderma* behandelten Böden verantwortlich sind (HARMAN & BJORKMAN, 1998).

Tatsächlich haben sich die meisten Untersuchungen auf die mikrobiellen Wechselwirkungen konzentriert und nicht auf einen möglichen Zusammenhang mit der Wirtspflanze, obwohl offensichtlich die Zunahme des Pflanzenwachstums mit dem Eindringen in das Wurzelsystem durch *Trichoderma harzianum* korreliert (KLEIFELD & CHET, 1992).

In weiteren Untersuchungen wurde beobachtet, daß Substrate mit *Trichoderma* auch in Abwesenheit von Pathogenen eine Zunahme des Pflanzenwachstums bewirken (BAKER, 1989; HARMAN & BJORKMAN, 1998). Die biologische Bekämpfung von sekundären Pathogenen in der Rhizosphäre, eine bessere Mineralstoffgewinnung, die Freisetzung von Nährstoffen und

organischem Material aus dem Boden sowie die Produktion von Pflanzenhormonen können teilweise das verbesserte Pflanzenwachstum erklären, wenn *Trichoderma* im Boden zugefügt worden ist (IMBAR et al., 1994; BEYRL, 1995). Doch die Möglichkeit, daß *Trichoderma* spp. auf das Wurzelgewebe einwirkt und bei der Wirtspflanze eine Resistenz gegen Pathogene induziert, ist selten untersucht worden (YEDIDIA et al., 1998).

Es ist bekannt, daß die Infektion mit einem nützlichen Pilz, wie z.B. einem Endomykorrhizapilz, eine schnelle und wirksame Antwort in den Wirtspflanzen gegen den Pathogenbefall bewirkt (MEERA et al., 1992). Es stellt sich die Frage, ob auch nicht-pathogene Pilze, wie z.B. *Trichoderma* spp., bei den Pflanzen eine Abwehrreaktion gegen den Angriff phytopathogener Pilze durch die Akkumulation von bestimmten Molekülen induzieren können (YEDIDIA et al., 1998).

Einige Untersuchungen beweisen, daß die Resistenzzunahme von Pflanzen mit einer endotrophen Mykorrhiza (VAM) assoziiert ist und metabolische Veränderungen im Wirt auftreten. Hierzu zählen die Verstärkung der Peroxidaseproduktion und phenolischen Verbindungen (SPANU et al., 1988, zitiert in YEDIDIA et al., 1998; ELSTNER et al., 1996), die Hydrolasenakkumulation, wie Chitinasen und  $\beta$ -1,3 Glucanasen mit potenzieller antimikrobieller Wirkung (DUMAS et al., 1984; SPANU et al., 1984 zitiert in YEDIDIA et al., 1998), und die Ablagerung struktureller Polymere, wie Ligninen (CAMPBELL & ELLIS, 1992) und hydroxiprolinreicher Glykoproteine (BENHAMOU, 1995, zitiert in YEDIDIA et al., 1998).

Unter der Annahme, daß die Produktion von Peroxidasen und phenolischen Verbindungen der Schlüssel im Resistenzprozess sein kann (DALISAY & KUC 1995; ELSTNER et al., 1996), und daß durch eine Akkumulation struktureller Stoffe die mechanische Stärke der Zellwand des Wirtes zunehmen kann, dann folgt, daß die Induktion solcher Abwehrmechanismen durch den nützlichen Pilz wahrscheinlich den Pathogenbefall einschränkt oder hemmt (YEDIDIA et al., 1998).

Ob jedoch die stimulierende Wirkung des Abwehrsystems der Pflanzen tatsächlich durch nicht-pathogene Pilze ausgelöst worden ist, muß noch durch Untersuchungen bestätigt werden.

## 1.8 BION als Elicitor der Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR)

Die Krankheitsbekämpfung im landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Kulturanbau basiert fast ausschließlich auf Fungizidanwendungen. Die Bedingungen im Gewächshaus oder im Feld begünstigen das Vorhandensein höherer Inokulumkonzentrationen sowie ein schnelles Wachstum von Pilzen. Die Pathogene sind dadurch in der Lage, sich in kurzer Zeit weit zu verbreiten, was mit mehreren Spritzungen von Fungiziden verhindert werden soll. Durch den schnellen Aufruf und die Resistenz der Pathogene gegenüber den Fungiziden wird eine wirksame Bekämpfung zunehmend erschwert (MENZIES & BELANGER, 1996). Wie bereits erwähnt, können chemische Produkte negative Auswirkungen auf Gesundheit und Umwelt haben, was zu einer verstärkten Suche nach Alternativen in der Schädlings- und Krankheitsbekämpfung geführt hat (KIRSTIN et al., 1999).

Eine Alternative zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten ist der Einsatz verschiedener prophylaktischer Verbindungen wie Benzothiadiazole (BTH) (SIEGRIST et al., 1997; INBAR et al., 1998), DL-3-Aminobuttersäure (BABA) (JEUN et al., 2000); Milsana (KHH) (KIRSTIN et al., 1999) oder Salycilsäure (SA) (SPLETZER & ENYEDI, 1999), deren Wirkung auf der Induktion der Resistenz der Pflanzen gegen den Pathogenangriff basiert.

**BION**, ein Pflanzenaktivator, ist als Benzothiadiazole (BTH) bekannt und entspricht einer neuen Art des Pflanzenschutzes. BION ist eine Verbindung, die die natürliche Abwehr der

Pflanzen aktiviert und in der Praxis gegen ein großes Spektrum von Pathogenen genutzt werden kann (ANONYMUS, 1996).

BTH ist für das Wachstum des Pilzes nicht toxisch (ANONYMUS, 1996). Seine Wirkung ist dem Effekt der Salicylsäure in der Signalinduktionskette ähnlich, das die Systemisch Aktivierte Resistenz (SAR) auslöst (LAWTON et al., 1996). Eine einzelne Anwendung von BTH bei Pflanzen kann vor einem großen Spektrum von Pathogenen schützen, wie z.B. gegen Echte Mehltaupilze- (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) (GÖRLACH et al., 1996), bei Tomaten gegen *Alternaria solani*, im Tabak gegen *Peronospora tabacina*, bei Reis gegen *Pyricularia oryzae* (ANONYMUS, 1996), oder im Gurkenanbau gegen *Sphaerotheca fuliginea* (KIRSTIN et al., 1999).

## 1.9 Systemisch Aktivierte Resistenz (SAR)

Die Bekämpfung zahlreicher phytopathogener Pilze ist grundsätzlich durch die Verwendung von synthetischen Fungiziden, langen Fruchtfolgen, Anzuchtbeetbegasung (JONES et al., 1991) und die Verwendung resistenter Sorten möglich (NASH & GARDNER, 1988). Durch den Mangel einzelner resistenter Gene gibt es bei einigen Kulturpflanzen keine resistenten Sorten, die gegen verschiedene pilzliche Krankheiten einen geeigneten Schutz bieten (NASH & GARDNER, 1988).

Es ist beobachtet worden, daß Pflanzen eine Immunität gegen einige Pflanzenkrankheiten entwickeln können, die durch Pilze, Bakterien oder Viren hervorgerufen werden kann. So können die Pflanzen z.B. durch die Bildung lokaler Nekrosen Moleküle aktivieren, die als Signale für die Aktivierung der natürlichen Abwehrmechanismen innerhalb der Pflanzen notwendig sind (ANONYMUS, 1996).

**Induzierte Resistenz** ist ein Phänomen, durch das die Pflanzen mittels einer Stimulation ein erhöhtes Niveau von Resistenz gegen ein großes Spektrum von Mikroorganismen erreichen (AGRIOS, 1997; ANFOKA & BUCHENAUER, 1997; KNOESTER et al., 1999). Der klassische Weg, induzierte Resistenz zu erzielen, ist mittels einer nekrotisierten pilzlichen Infektion. Dadurch entsteht eine erhöhte Resistenz gegen einen nachfolgenden Pathogenangriff (STICHER et al., 1997; KNOESTER et al., 1999). Die Resistenz wird lokal am Inokulationsort, aber auch systemisch im Gewebe fern vom Behandlungsort exprimiert (STICHER et al., 1997). Diese Form von induzierter Resistenz ist als Systemisch Aktivierte Resistenz SAR bekannt (AGRIOS, 1997; STICHER et al., 1997). SAR wird durch den Angriff von Pathogenen aktiviert, und als Folge wird eine schnelle Zellnekrose im infizierten Gewebe ausgelöst (HUNT & RYALS, 1996; GEERT et al., 1999; DANN & DEVERALL, 2000). Der Infektionsprozeß aktiviert die Krankheitsresistenz im nicht infizierten Blattgewebe und schützt gegen ein großes Spektrum von Krankheiten, die durch viele Pathogene verursacht sein können (ROSS et al., 1961, zitiert in SPLETZER & ENYEDI, 1999). Die Resistenzprinzip kann in weiter entfernte, befallsfreie Pflanzenteile transportiert werden und dort eine Aktivierung der Abwehrmechanismen auslösen (SCHLÖSSER, 1997).

Der natürliche Schutz der Pflanzen gegen einen Angriff von Insekten oder phytopathogenen Pilzen wird insbesondere auf konstitutive Barrieren der Pflanze zurückgeführt, die vor dem Angriff vorliegen (STICHER et al., 1997; MURILLO et al., 1999). Die Pflanzen können die Schutzmechanismen aktivieren, sobald sie Kontakt mit dem Pathogen haben. Die Effektivität solcher Abwehrmechanismen ist abhängig von der Invasionsgeschwindigkeit des Pathogens und der Aufbaugeschwindigkeit mechanischer Barrieren durch die Pflanzen (SCHLÖSSER, 1997; MURILLO et al., 1999). Die Bedeutung dieser Abwehrreaktion ist zum größten Teil diskutiert und dokumentiert worden (CHESTER, 1933; ELSTNER et al., 1996; GÄUMANN, 1946, zitiert in STICHER, et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß die Pflanzen, die mit einem

nicht-virulenten Mikroorganismus geimpft werden, bei nachfolgenden Infektionen mit dem gleichen oder einem verwandten Pathogen einen natürlichen Schutz entwickelt haben.

SAR wurde im Gurkenanbau (RYAN, 1990, zitiert in STICHER et al., 1997) und in Erbsenpflanzen (DANN & DEVERALL, 2000) mittels *Pseudomonas syringae* nach sieben Stunden induziert. In anderen Untersuchungen wurde in Pflanzen mit dem Pilz *Colletotrichum lagenarium*, Verursacher der Anthraknose, Resistenz gegen mehrere Krankheiten von Bakterien, Viren und Pilzen induziert (KESSMANN et al., 1994; HAMMERSCHMIDT & KUC, 1995, zitiert in STICHER et al., 1997). SAR wurde in Tomaten mittels TMV gegen *Phytophthora infestans* induziert (ANFOKA & BUCHENAUER, 1997). Bei einer Impfung mit dem Pathogen *Peronospora parasitica* unter die Epidermis des Stengels von Tabak wurde SAR in den Blättern zwei bis drei Wochen nach der ersten Inokulation induziert (COHEN & KUC, 1981). Mittels (**PGPR**) wurde ein interessanter Fall von aktivierter Resistenz gezeigt: wurden die Rhizobakterien im Boden appliziert, haben sie die Rhizosphäre besiedelt und eine Resistenz in den Blättern oder im Stengel induziert (STICHER et al., 1997; ENEBAK & CAREY, 2000; VAN LOON et al., 2000). Aufgrund der Tatsache, daß die PGPR-Rhizobakterien die Pflanzen systemisch gegen verschiedene Pathogene schützen können, ohne Symptome zu verursachen, wurde diese Form von Resistenz **Systemisch Induzierte Resistenz (SIR)** genannt (ALSTRÖM, 1991; VAN PEER et al., 1991; LIU et al., 1995; PURKAYASTHA, 1998; HAN et al., 2000; VAN LOON et al., 2000). Zur Unterscheidung dieser Form von der Aktivierten Resistenz (SAR) wurde die Systemisch Induzierte Resistenz eingeführt (SIR) (PIETERSE, et al., 1996).

Systemisch induzierte Resistenz (SIR) unterscheidet sich von der Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR) darin, daß die SIR unabhängig von Salicylsäure ist und mit den PR-Proteinen nicht verbunden ist (KNOESTER et al., 1999).

Wahrscheinlich wird SAR durch schnelle Akkumulation einiger Familien von PR-Proteinen sowohl intra- als auch extrazellulär in den Blättern induziert (WARD et al., 1991; CENTURY et al., 1995). Einige dieser PR-Proteine, die sich während der SAR akkumulieren, haben enzymatische Aktivitäten (z.B. Glucanasen und Chitinasen) gezeigt, die mit den Abwehrmechanismen gegen Pathogene wie Pilze, Viren und Bakterien übereinstimmen (MALAMY et al., 1992; NIDERMAN et al., 1995; PRELL, 1996; AGRIOS, 1997; HARTLEB et al., 1997; SCHLÖSSER, 1997).

### 1.9.1 PR-Proteine

PR-Proteine werden als Pflanzenproteine definiert, die sich nach einem Pathogenangriff akkumulieren oder induziert sind, und in einer gesunden Pflanze nicht vorliegen (CUTT & KLESSIG, 1994; VAN LOON et al., 1994; GORDON et al., 1997). Ein Angriff kann nicht nur durch Mikroorganismen erfolgen, sondern auch durch Nematoden, Insekten, Herbivoren, chemische Behandlungen oder andere Streßfaktoren (STICHER et al., 1997; MURILLO et al., 1999). Anorganische Verbindungen wie z.B. Kaliumdihydrogenphosphat, Silbernitrat, UV-Licht, Pathogene und deren Produkte sowie mikrobielle Toxine können als Elicitoren wirken (HARTLEB et al., 1997; SCHLÖSSER, 1997).

PR-Proteine wurden zuerst in TMV-infizierten Pflanzen gefunden (STICHER et al., 1997), später auch in den interzellulären Waschflüssigkeiten pathogeninfizierter oder mit biotischen oder abiotischen Elicitoren behandelter Blätter (PRELL, 1996), wie z.B. 2,6-Dichloroisoinikotinsäure (METRAUX et al., 1991), DL- $\beta$ -amino-n-Buttersäure (BYUNG et al., 1997) oder Benzothiadiazole-7-carbothiotic acid (GÖRLACH et al., 1996; LAWTON et al., 1996; DANN & DEVERALL, 2000). Viele dieser Proteine stammen aus Zellwänden und Zellvakuolen.



PR-Proteine sind in zahlreichen Pflanzen und unter verschiedenen Arten von Stress gefunden worden (BOL et al., 1990; STINTZI et al., 1993). Einige PRs schließen PR-1; ( $\beta$ -1,3-Glucanasen PR-2); (Chitinasen PR-3, PR-4) und (Osmotin PR-5) ein und zeigen eine antimikrobielle Aktivität (MAUCH et al., 1988; WOLOSHUK et al., 1991; HARTLEB et al., 1997). Chitinasen und  $\beta$ -1,3 Glucanasen haben eine synergetische Wirkung (MAUCH et al., 1988) und setzen Moleküle frei, die als Elicitoren wirken können (KUROSAKI, 1986). Mittels Induktorapplikation erfolgt bei der Bildung und Aktivierung von PR-Proteinen eine Synthese der Schlüsselenzyme Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und Chalkon-Synthase (CHS) (PRELL, 1996). Zu den Schlüsselenzymen gehören auch Peroxidasen, welche mit neuen Isoenzymen und einer erhöhten Gesamtaktivität auftreten und u.a. Protein und Lignin verbinden (ELSTNER et al., 1996; ANFOKA & BUCHENAUER, 1997; SCHLÖSSER, 1997).

PR-Proteine akkumulieren sich in großer Dichte am Ort der Infektion, einige sammeln sich auch an nicht-inokulierten Stellen (STINTZI et al., 1993). Die Ausprägung der SAR-Proteine variiert mit den Pflanzenarten, z.B. wurde bei Tabak und *Arabidopsis* die extrazelluläre PR1 als wichtigstes Protein induziert, wohingegen bei Gurken die extrazelluläre PR-1 schwach ausgeprägt war, dafür die Ausprägung von Chitinase hoch (KESSMANN et al., 1994).

Mittels transgener Pflanzen, in denen die Expression der entsprechenden Gene stattfindet, kann die Rolle der PR-Proteine Chitinasen und 1,3 Glucanasen bei der Abwehr zusätzlich bestimmt werden (HARTLEB et al., 1997; MURILLO et al., 1999). So nimmt z.B. in Tabak bei einer Überexpression von PR-1 die Resistenz gegen eine Infektion von *Peronospora tabacina* und *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* erheblich zu (ALEXANDER et al., 1993). Bei übermäßiger Ausprägung der 1,3-Glucanase von Sojabohnen in Tabak nimmt die Resistenz gegen *Phytophthora megasperma* und *Alternaria alternata* zu (YOSHIKOWA et al., 1993). Bei Kohl- und Tabakpflanzen erhöht eine Übermenge der Chitinase von Bohnen die Resistenz gegen den Angriff von *Rhizoctonia solani* und anderer Pathogene unter Feldbedingungen (GRISON et al., 1996).

Die Ausprägung der PR-Proteine korreliert mit der Resistenzzunahme einiger Pflanzen. Die genaue Funktion dieser PRs bei der Abwehrreaktion gegen Viren, Bakterien und Pilze ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt worden (STICHER et al., 1997).

## 1.10 Ziele der Arbeit

Bohnen (*Phaseolus vulgaris* L.), Linsen (*Lens culinaris* L.) und Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.) sind eine wichtige tägliche Nahrungsquelle für die Bevölkerung in Mittel- und Südamerika. Diese Leguminosen werden jedoch häufig von mehreren phytopathogenen Pilzen befallen. So sind z.B. in den tropischen und subtropischen Regionen Ecuadors Bohnen, Linsen und Kichererbsen wichtige Wirte für *C. rolfii* Sacc. Dieser Pilz verursacht Sämlings- und Umfallkrankheiten sowie Fußfäule an Keimlingen und stellt überdies einen hemmenden Faktor bei der Produktion solcher Kulturen dar. Die von *C. rolfii* verursachten Schäden sind so groß, daß verschiedene Bekämpfungsmethoden, hauptsächlich auf der Basis chemischer Produkte, notwendig sind. Der Einsatz chemischer Bekämpfungsmittel – Fumiganten und Fungizide – verursacht hohe Kosten und je nach Typ der angebauten Kulturpflanzen kann dies dazu führen, daß der betreffende Kulturanbau ökonomisch nicht mehr rentabel ist.

Die Suche nach neuen Bekämpfungsstrategien gegen Pflanzenkrankheiten im Kulturanbau ist eine Antwort auf die Notwendigkeit, die Dosierungen und die Zahl chemischer Produkte zu verringern, die in vielen Ländern ohne Kontrolle und Bewußtsein eingesetzt werden. Die Nutzung von Pestiziden in der Landwirtschaft belastet die Umwelt, wirkt sich schädlich auf die Gesundheit der Menschen aus und verursacht Resistenzen in den Mikroorganismen, die

wiederum zu einem vermehrten Einsatz von Pestiziden zwingen, um die pilzlichen Pathogene kontrollieren zu können. Abgesehen von dieser Problematik sind aber auch die ökonomischen Mittel der Landwirte in Südamerika und anderen Teilen der Welt allgemein beschränkt und oftmals nicht ausreichend, um die teuren chemischen Bekämpfungsmittel gegen Krankheitserreger einsetzen zu können.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, wirksame biologische Bekämpfungsmaßnahmen mittels *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* zu entwickeln sowie auch sein Antagonismuspotential gegen weitere wichtige bodenbürtige phytopathogene Pilze zu testen.

*Trichoderma* spp. ist ein saprophytischer Pilz, der keinen Schaden an Pflanzen verursacht. Durch seine Fähigkeit, das Wachstum anderer Pilze zu hemmen, hat er in der Landwirtschaft bereits zunehmend an Interesse gewonnen. Ein Ziel dieser Arbeit ist deshalb zu prüfen, ob die Anwendung von *Trichoderma* spp. als Samen- und Bodenbehandlung hinsichtlich der Formulierung der Präparate und der Inokulumproduktionsträger in Bezug auf unterschiedliche Kulturnährmedien zur erfolgreichen Bekämpfung von *C. rolfii* führt.

Neben der Untersuchung seiner Antagonismusfähigkeit gegenüber den Krankheitserregern verfolgt diese Arbeit, bestimmte *Trichoderma*-Stämme zu selektieren, die gegenüber den Fungiziden eine besonders ausgeprägte Verträglichkeit und Resistenz zeigen. Diese Stämme können in Systemen integrierter Bekämpfungsmaßnahmen eingesetzt werden und damit zu einem verringerten Einsatz chemischer Produkte in der Krankheitsbekämpfung führen. Chemische Rückstände bei geernteten Produkten, die zu Gesundheitsschäden beim Menschen führen können, können so weitgehend vermieden werden.

Als weitere Alternative zur chemischen Pflanzenkrankheitsbekämpfung wird in dieser Arbeit der Einsatz von BION, bekannt als Benzothiadiazole (BTH) getestet, dessen Wirkung auf die Induktion von pflanzlichen Abwehrmechanismen gegen Pathogenangriffe zurückzuführen ist. Dieser Teil der Arbeit untersucht unter Gewächshausbedingungen die Wirkung von BION bei Leguminosenpflanzen von Bohne (*Phaseolus vulgaris*), Linse (*Lens culinaris*) und Kichererbse (*Cicer arietinum*) sowie seine Fähigkeit als Induktor der natürlichen Abwehrmechanismen gegen *C. rolfii*.

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, daß die Anwendung von *Trichoderma* und BION zum einen eine mögliche wirksame Alternative zur chemischen Bekämpfung zahlreicher Pflanzenkrankheiten sein kann, daß sie zum anderen aber auch ein wichtiger Bestandteil integrierter Bekämpfungsmaßnahmen werden kann. Zielsetzung ist es, die zugrundeliegenden Mechanismen des *Trichoderma*-Antagonismus weiter aufzuklären und die durch BION aktivierten Mechanismen der induzierten Resistenz besser zu verstehen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

Für die Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung und der induzierten Resistenz sowohl im Labor als auch im Gewächshaus wurden die folgenden Materialien verwendet:

#### 2.1.1 Pilze

Die für die Untersuchungen verwendeten Pilze stammen aus der Sammlung des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Giessen.

***Trichoderma* spp.:** Von den von KÖHL (1989) im Rahmen eines Screening-Programms gesammelten *Trichoderma*-stämmen verschiedener geographischer Herkunft, unterschiedlicher Klimazonen, Standorte und Substrate wurden einige *Trichoderma*-Arten ausgewählt, die in **Tab. 1** aufgelistet sind. Die ausgelesenen Trichodermapilze wurden im Labor auf verschiedenen Nährmedien auf ihre Eigenschaften als natürliche Antagonisten gegen wichtige phytopathogene Pilze getestet.

***Corticium rolfsii*:** Die von ausgewählten phytopathogenen Erregern hervorgerufenen Pflanzenkrankheiten, die bereits bekannt sind, sind in **Tab. 2** zusammengefasst. Unter besonderer Berücksichtigung wurde hier eine biologische Bekämpfung von *Corticium rolfsii*, Hauptverursacher von Sämlings- und Umfallkrankheiten an Keimlingen sowie Fußfäulen (KRANZ, 1982) im Labor und im Gewächshaus getestet und durchgeführt.

**Tabelle 1:** Liste der ausgewählten untersuchten Pilzstämmen der Gattung *Trichoderma* spp.

Stammnummer	Art	geographische Herkunft	Klimazone	Standort	Substrat
T-12j	<i>Trichoderma</i> spp.	(*)	(*)	(*)	(*)
T-024	<i>T. hamatum</i>	Buseck	1	Garten	Gras
T-029	<i>T. koningii</i>	Buseck	1	Buchenwald	Rinde
T-040	<i>T. harzianum</i>	Langgöns	1	Garten	Holz
T-047	<i>T. hamatum</i>	Herdecke	1	Birke	Holz
T-093	<i>T. hamatum</i>	Breungeshain	2	Eichenwald	Holz
T-115	<i>T. viride</i>	Hoherodskopf	2	Fichtenwald	Wurzeln
T-116	<i>T. koningii</i>	Hoherodskopf	2	Fichtenwald	Boden
T-124	<i>T. harzianum</i>	Leihgestern	1	Grünland	Boden
T-126	<i>T. harzianum</i>	Rußland	1	Torf	Torf
T-134	<i>T. hamatum</i>	Hoherodskopf	2	Laubwald	Boden
T-165	<i>T. koningii</i>	Launsbach	1	Acker	Boden
T-166	<i>T. hamatum</i>	Dornach (CH)	1	Acker-bio-dy	Boden
T-171	<i>T. harzianum</i>	China	1	Acker	Boden
T-190	<i>T. viride</i>	Schiffenberg	1	Laubwald	Holz
T-192	<i>T. viride</i>	Schiffenberg	1	Nadelwald	Boden
T-210	<i>T. koningii</i>	Beuern	1	Fichtenwald	Holz
T-218	<i>T. viride</i>	Beuern	1	Buchenwald	Rinde
T-226	<i>T. viride</i>	Beuern	1	Nadelwald	Boden
T-236	<i>T. koningii</i>	Buseck	1	Fichtenwald	Holz
T-250	<i>T. harzianum</i>	Taunus	2	Eichenwald	Holz
T-257	<i>T. harzianum</i>	Feldberg	2	Buchenwald	Holz
T-309	<i>T. hamatum</i>	Alesund (N)	3	Nadelwald	Boden
T-390	<i>T. koningi</i>	(*)	(*)	(*)	(*)
T-391	<i>T. harzianum</i>	Gießen	1	Acker	Boden

(\*) unbekannt

**Tabelle 2: Liste der ausgewählten untersuchten phytopathogenen Pilze**

Stamnummer	Pilzstämme	Krankheitsbezeichnung
Ss	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Stengelfäule
Rs193	<i>Rhizoctonia solani</i>	Idem
Rs194	<i>Rhizoctonia solani</i>	Idem
Fo200	<i>Fusarium oxysporum</i>	Wurzelbrand
Fm	<i>Fusarium moniliforme</i>	Wurzelfäule
Fg	<i>Fusarium graminearum</i>	Idem
Fc207	<i>Fusarium culmorum</i>	Idem
Bc300	<i>Botrytis cinerea</i>	Grauschimmel
As245	<i>Alternaria solani</i>	Blattflecken
Col363	<i>Colletotrichum spp.</i>	Brennflecken
Cer427	<i>Cercospora spp.</i>	Blattflecken
Pb89	<i>Phoma betae</i>	Umfallkrankheit
Pu328	<i>Pythium ultimum</i>	Umfallkrankheit
Pu329	<i>Pythium ultimum</i>	Umfallkrankheit
Pd330	<i>Pythium debaryanum</i>	Umfallkrankheit
Sep85	<i>Septoria spp.</i>	Spelzenbräune
Cr <sub>2</sub>	<i>Corticium rolfii</i>	Stengelfäule

### 2.1.2 Versuchspflanzen

Unter den Kulturpflanzen, die als wichtige Wirte für *C. rolfii* bekannt sind, wurden Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris*)-Sorte "Saxa"; Linsen (*Lins culinaris*); Kichererbsen (*Cicer arietinum*); Ackerbohnen (*Vicia fabae*); und Erbsen (*Pisum sativum*) für die verschiedenen Versuchsreihen ausgewählt. Die Buschbohnen- und Ackerbohnen Samen stammen aus der Sammlung des Institutes, Erbsen, Linsen- und Kichererbsen Samen aus ökologischem Anbau wurden im Handel besorgt.

### 2.1.3 Nährmedien

Alle Medien wurden mit entionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

#### Kartoffel-Glucose-Agar (PDA)

Geschälte Kartoffeln	200g
Glucose	20g
Agar	14g

#### Malz-Pepton-Agar (MPA)

Malzextrakt-Bouillon	20g
Pepton	2g
Agar	14g

#### Kartoffel-Glucose-Flüssigmedium (PD)

Geschälte Kartoffeln	200g
Glucose	20g

#### Malz-Pepton-Flüssigmedium (MP)

Malz	20g
Pepton	2g

#### Kartoffel-Pepton-Glucose-Agar (PDYA)

Geschälte Kartoffeln	1200g
Glucose	
Pepton	2g

#### Hefeextrakt-Glucose-Agar (GHA)

Hefeextrakt	2g
Glucose	10g
Agar	14g

#### Kartoffel-Pepton-Glucose-Flüssigmedium (PDY)

Geschälte Kartoffeln	200g
Glucose	20g
Pepton	2g

#### Glucose-Hefe-Flüssigmedium (GH)

Glucose	10g
Hefeextrakt	2g

**Glucose-Hefe-Flüssigmedium (GH)**

Glucose	10g
Hefeextrakt	2g

**Kartoffel-Glucose-Agar (PDA)  
(Selektivmedium)**

Geschälte Kartoffeln	200g
Glucose	20g
Agar	14g
Nach Autoklavieren	
Benomyl	30mg

**Kartoffel-Glucose-Agar (PDA)  
(Selektivmedium)**

Geschälte Kartoffeln	200g
Glucose	20g
Agar	14g
Nach Autoklavieren	
Prochloraz	62,5mg

**Bengalrosa-Glucose-Hefeextrakt-Agar  
(Rote-Platte)**

Glucose	10g
Hefeextrakt	2g
Agar	14g
Nach Autoklavieren	
Streptomycinsulfat	125mg
Bengalrosa	25mg

**V8-Agar**

V8-Gemüsesaft	200ml
1N NaOH	6ml
Agar	14g

**Czapek-Dox-Agar**

NaNO <sub>3</sub>	33g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01g
Glucose	30g
Agar	14g

**H40A**

Hirseemehl	40g
Agar	14g

**H10/I**

Hirseemehl	10g
------------	-----

**Wasser-Agar**

Agar	14g
------	-----

**H20A**

Hirseemehl	20g
Agar	14g

**H5/I**

Hirseemehl	5g
------------	----

**2.1.4 Fungizide**

Die in den Laborversuchen verwendeten Pflanzenschutzmittel, die auf den verschiedenen Selektivmedien und in Fungizidempfindlichkeitstests gegen zahlreiche Pilze getestet wurden, sind in der nachfolgenden Liste angeführt. Die Mengen an aktivem Wirkstoff sind in Klammern angegeben.

**Benomyl**

Handelsprodukte:  
Gruppenzugehörigkeit:  
Firma:

Du Pont Benomyl (50%)  
Benzimidazolcarbamat  
Du Pont, Deutschland

**Prochloraz**

Handelsprodukte:  
Gruppenzugehörigkeit:  
Firma:

Sportak (400 g/l)  
Imidazol  
Schering AG

**Triadimenol**

Handelsprodukte:	Bayfidan (250 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Triazolderivat
Firma:	Bayer AG

**Triadimefon**

Handelsprodukte:	Bayleton 100 (100 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Triazol
Firma:	Bayer AG

**Vinclozolin**

Handelsprodukte:	Ronilan (50%)
Gruppenzugehörigkeit:	Oxazolidin
Firma:	BASF AG

**Triforin**

Handelsprodukte:	Saprol (190 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Piperazin
Firma:	Shell Agrar GmbH

**Bitertanol**

Handelsprodukte:	Baycor flüssig(500 g/l)-Baycor Spritzpulver (25 %)
Gruppenzugehörigkeit:	Triazol
Firma:	Bayer AG

**Tebuconazol**

Handelsprodukte:	Folicur (250 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Triazol
Firma:	Bayer AG

**Mancozeb**

Handelsprodukte:	Dithane Ultra W (80 %)
Gruppenzugehörigkeit:	Ethylen-bis-dithiocarbamat
Firma:	Rohm & Hass-Deutschland GmbH

**Chlorthalonyl**

Handelsprodukte:	Daconil (500 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Benzosäure
Firma:	Sipuro GmbH

### Carbendazim

Handelsprodukte:	Derosal (59,4 %)-Derosal flüssig (450 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Benzimidazol-Derivat)
Firma:	BASF AG

### Fenpropimorph

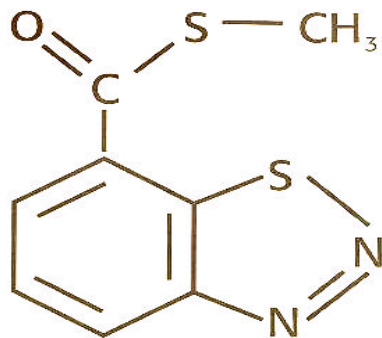
Handelsprodukte:	Corbel (750 g/l)
Gruppenzugehörigkeit:	Morpholin
Firma:	BASF AG

### Metalaxyl

Handelsprodukte:	Ridomil (50 %)
Gruppenzugehörigkeit:	Acylalanin
Firma:	Ciba-Geigy AG

### 2.1.5 Resistenzinduktor

Der Resistenzinduktor **Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-Methylester** ist der Wirkstoff des Handelsproduktes **BION<sup>®</sup>** und gehört zur chemischen Klasse der Benzothiadiazole. Der Resistenzinduktor BION<sup>®</sup>, dessen Strukturformel in der **Abb. 4** vorliegt, hat im Gegensatz zu Fungiziden keine direkte Wirkung auf das Pathogen, sondern aktiviert die in den Pflanzen natürlich vorhandenen Abwehrmechanismen.



<b>Handelsprodukt:</b>	BION <sup>®</sup> Granulat (50 % a.i.)
<b>Wirkstoff:</b>	Acibenzolar-S-Methyl
<b>Chemische Bezeichnung:</b>	Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-Methylester
<b>Wirkungstyp:</b>	Pflanzenaktivator
<b>Anwendung:</b>	Resistenzaktivator

**Abb. 4** Struktur und Eigenschaften des Pflanzenaktivators BION<sup>®</sup>





### 2.2.3 Antagonismus von *Trichoderma* spp. *in vitro*

Unter Laborbedingungen wurde eine Reihe von Untersuchungen zur Antagonismusth tigkeit von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii*, aber auch gegen andere phytopathogene Pilze durchgeführt.

#### Antimykotische Wirkung auf festen Medien

Agarscheiben von 5 mm Durchmesser verschiedener *Trichoderma* spp. und von *C. rolfii* wurden auf PDA-, MPA-, PDYA-, GHA-, V8-, HfPDA-, H5-, H10-, H20-, und H40-Agarmedien einander gegenüber an den Rand einer Petrischale gelegt und bei 25 C inkubiert. Es wurden 3 Wiederholungen angelegt. Parallel dazu wurden Agarscheiben (  5 mm) von *Trichoderma* spp. und von *C. rolfii* je Nährmedium als reine Kultur angelegt. Diese dienen zur Kontrolle eines normalen Wachstums sowohl für *Trichoderma* spp. als auch für *C. rolfii* und andere phytopathogene Pilze.

Spätestens nach 2 bis 5 Tagen sind beide Pilze aufeinandergetroffen. In Abhängigkeit von der Antagonismusth tigkeit von *Trichoderma* haben die Pilze einen Bereich oder eine Zone gebildet, die als eine Grenze oder Trennungslinie beobachtet wurde. In dieser Zone konnten beide Pilze ihre Aggressivität zeigen. Da nicht alle *Trichoderma*-Stämme gleich aggressiv sind, konnten verschiedene Antagonismustypen beobachtet und bonitiert werden:

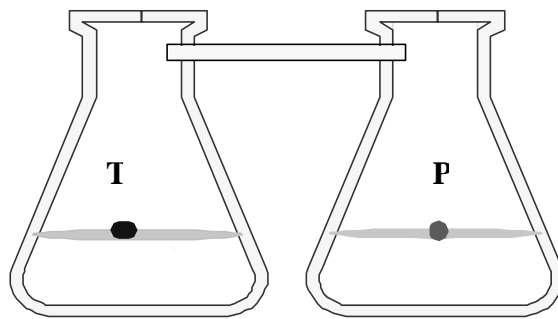
- *Trichoderma* spp. ist aggressiv und überwächst den Pathogen nach dem Aufeinandertreffen.
- *Trichoderma* spp. und der Pathogen treffen sich und haben Kontakt, aber keiner der beiden überwächst den anderen.
- *Trichoderma* spp. und der Pathogen wachsen, haben aber keinen Kontakt. Es entsteht eine Trennungslinie von 2-5 mm Breite.
- *Trichoderma* und der Pathogen treffen sich, letzterer wächst bis zu 10 mm weiter, stirbt dann ab und als Folge überwächst *Trichoderma* spp. den Pathogen.
- Der Pathogen ist aggressiv und überwächst nach dem Kontakt die *Trichoderma* spp.

Aus der Überwachungszone wurden mit einem K hrbohrer Agarscheiben (  5 mm) ausgestanzt und auf ein Selektivmedium überführt, auf dem *Trichoderma* spp. abgetötet werden, *C. rolfii* aber wachsen kann. Dieses Selektivmedium setzt sich aus PDA, MPA oder PDYA mit jeweils einem Zusatz von 15  g Benomyl AS/ml zusammen, der mit Ausnahme benomyl-resistenter Stämme die meisten *Trichoderma* spp. sicher abtötet. Wenn die Agarscheiben auf dem Selektivmedium nach 3 Tagen kein Wachstum gezeigt haben, dann werden sie auf ein entsprechendes Medium ohne Fungizidzusatz überführt. Konnte *C. rolfii* weder auf dem Selektivmedium noch auf dem Normalmedium wachsen, dann war *C. rolfii* durch den zu prüfenden *Trichoderma* - Stamm abgetötet worden, der somit als wirkungsvoller Antagonist angesehen werden durfte.

#### Antimykotische Wirkung von volatilen Stoffen von *Trichoderma* spp.

Ausgeschiedene volatile Stoffe, die durch *Trichoderma* spp. gegen das Wachstum einiger Pilze wirksam sind, wurden unter Laborbedingungen auf verschiedenen Nährmedien und bei verschiedenen Inokulationszeiten geprüft.

**Dualkulturen in Kolben:** Tests der Wachstumshemmung phytopathogener Pilze wurden in miteinander verbundenen Erlenmeyerkolben mit je 200 ml PDA-, MPA-, PDYA-, GHA-, V8-HfPDA-, H5-, H10-, H20- und H40-Nährmedium mit 3 Tagen alten, inokulierten *Trichoderma*-Kulturen durchgeführt (siehe Abb. 5). Die Kulturen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 25°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden in anderen Flaschen mit dem gleichen Nährmedium die Pathogene mittels Agarscheiben inokuliert. Die mit den *Trichoderma*- und Pathogenkulturen gefüllten Erlenmeyerkolben waren mit Parafilm verbunden und luftdicht verschlossen. Das Ziel war zu bestimmen, ob volatile Stoffe von *Trichoderma* das Wachstum phytopathogener Pilze ohne eine mögliche Kontamination oder Kontakt zwischen beiden Pilzen hemmen kann. Als Kontrolle und für entsprechende Auswertungen sind *Trichoderma* und *C. rolfii* als reine Kulturen unter den gleichen Bedingungen gewachsen.



**Abb. 5** Test zur Wachstumshemmung phytopathogener Pilze durch ausgeschiedene volatile Stoffe von *Trichoderma* spp.  
(T) *Trichoderma* spp.  
(P) Pathogen

**Dualkulturen auf Petrischalen:** Um die Wachstumshemmung phytopathogener Pilze weiter ermitteln zu können, wurden in Petrischalen auf PDA-, MPA-, PDYA-, GHA-, V8-, HfPDA-, H5-, H10-, H20- und H40-Nährmedien Versuche mit *Trichoderma* bei Inokulationszeiten von 1, 2, 3, 4, 5 und 10 Tagen durchgeführt. Ziel der Tests war zu bestimmen, nach welcher Zeit *Trichoderma* mehr volatile Hemmstoffe gegen den Pathogen ausscheidet. Das *Trichoderma*-Kulturmedium wurde bei 25°C inkubiert. Petrischalen mit MPA-Medium wurden mit *C. rolfii* inokuliert und zusammen mit dem *Trichoderma*-Medium verschiedener Inokulationszeiten mit Parafilm fixiert und luftdicht verschlossen. Zwischen die beiden Pilze wurde ein rundes, steriles Filterpapier gestellt, um eine mögliche gegenseitige Kontamination der Pilze zu vermeiden. Um zu überprüfen, ob das Wachstum des Testpilzes gehemmt wird, wurde als Kontrolle *C. rolfii* im Nährmedium als reine Kulturen inokuliert. Die Auswertung erfolgte anhand der Wachstumsraten ebenfalls in Durchmesser (mm/24h) im Vergleich mit den durchgeführten Untersuchungen.

**Abbau der Sklerotien von *C. rolfii*:** Die Sklerotien wurden von verschiedenen Kulturmedien geerntet, für zwei Minuten mit einer 10%igen Klorix-Lösung oberflächensterilisiert und dabei eine Minute lang kräftig durchgeschüttelt. Nach KÖHL (1989) liegt die optimale Sterilisierungsdauer bei etwa zwei Minuten. Damit kann die Keimung der Sklerotien durch anhaftendes Myzel vermieden werden. Um ihre Keimungsfähigkeit zu ermitteln, wurden zunächst zehn Sklerotien auf verschiedene

Nährmedien überimpft. Um den Antagonismus von *Trichoderma* zu testen, wurden weitere zehn Sklerotien an den Rand der MPA-Petrischale gelegt. In die Mitte wurde eine Agarscheibe (Ø 5mm) von *Trichoderma* gelegt und die Petrischalen bei 25°C inkubiert. So wurde innerhalb von 48 Stunden ermittelt, ob *Trichoderma* fähig sind, das Myzel und die Sklerotien zu parasitieren. Parallel dazu wurden große Mengen Sklerotien in eine eine Woche alte, reine *Trichoderma*-Kultur gelegt. Nach Ablauf von 30 Tagen wurde ausgewertet, ob die Sklerotien besiedelt und parasitiert worden waren. Die Sklerotien wurden erneut mit der 10%igen Klorix-Lösung oberflächensterilisiert, um *Trichoderma* abzutöten. Dann wurde ein Teil der Sklerotien auf ein MPA-Medium ausgelegt, der Rest auf ein Selektivmedium mit 25 µg/ml Benomyl. Mit beiden Ansätzen konnte die Lebensfähigkeit der Sklerotien festgestellt werden.

#### 2.2.4 Inokulumgewinnung von *Trichoderma* spp.

Die Produktion von Inokulum in großen Mengen und in kurzer Zeit ist eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung eines Antagonisten in Systemen biologischer Bekämpfung. Zur Durchführung der verschiedenen Versuche wurden im Labor alternative Verfahren zur Inokulumgewinnung geprüft und die verschiedenen Nährmedien getestet.

##### Konidien

**Auf Agarmedien:** Myzel, Chlamydosporen und Konidien von *Trichoderma* spp. wurden auf PDA-Agarmedium in sterilen Petrischalen gewonnen. Nach sieben Tagen wurde das bei 25°C inkubierte Medium mit sterilem Wasser langsam 5 Minuten lang geschüttelt und auf die gewünschten Konidienkonzentrationen eingestellt.

**In Flüssigmedien:** Biomasse von *Trichoderma* spp., Myzel, Chlamydosporen und Konidien wurden auf 200 ml Malz-Pepton- und Glucose-Kartoffeln-Flüssigkultur hergestellt. Die Medien wurden zunächst 25 Minuten autoklaviert, danach wurden sie mit drei Agarscheiben (Ø 5mm) beimpft. Die Flüssigmedien wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Nach sieben Tagen wurde das Material geerntet und mit sterilem Wasser (300 ml) zwei Minuten geschüttelt und dreimal gewaschen, immer mit dem gleichen Wasser. Danach wurde die Waschflüssigkeit auf die gewünschte Konidienkonzentration eingestellt.

##### Biomasse

Für die Herstellung größerer Mengen an Biomassen von *Trichoderma* spp. wurden Hirsekörner verwendet.

**Hirsekörnermedium:** Die Hirsekörner (50 g) wurden vier Minuten in 400 ml Leitungswasser gekocht. Dann wurde das Wasser abgegossen und die Körner in Erlenmeyer (500 ml) gegeben und 25 Minuten lang autoklaviert. Die Kulturen wurden mit vier Agarscheiben (Ø 5mm) von *Trichoderma*-Stämmen beimpft und für 14 Tage bei 25°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 bis 5 ml sterilem Wasser wurde das Medium immer feucht gehalten. Hier wachsen *Trichoderma* spp. sehr schnell und produzieren in großen Mengen Chlamydosporen und Konidien. Nach 14 Tagen wurden die Kulturen durch Zugabe von einem Liter sterilem Wasser und für eine Minute kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Konidien suspensionen abgesiebt und in

ein Liter Flaschen im Kühlschrank bei 6°C gelagert. Dieses Material wurde zur Herstellung der gewünschten Konidienkonzentration verwendet.

### 2.2.5 Inokulumträger von *Trichoderma* spp.

Hier wurde eine mögliche Nutzung verschiedener fester und flüssiger Substanzen als Inokulumträger von *Trichoderma* spp. untersucht. Das gewonnene Material wurde im Labor hergestellt und unter Gewächshausbedingungen für die Samenbeizung und Bodenbehandlung getestet.

**Wasser:** In diesem Fall wurde Wasser als einziges Transportmittel für *Trichoderma* spp. benutzt. Die gewonnenen Konidiensuspensionen aus Agar- oder Flüssigmedium wurden auf 500 ml Wasser in der gewünschten Konzentration eingestellt. Bei den Versuchen wurden Aufwandmengen von 1, 5, 10 15 und 20 ml je Topf der Konidiensuspensionen appliziert.

**Hirseflüssigmedium:** Für die Herstellung von *Trichoderma*-Biomasse auf Hirseflüssigmedium wurde die oben beschriebene Methode zur Gewinnung von Hirsekörnermedium benutzt. Die gewonnenen *Trichoderma*-Suspensionen enthielten außer Wasser als Lösungsmittel auch kleine Partikel von Hirsekörnern, die als Nahrungsquelle für *Trichoderma* dienen. Biomassensuspensionen wurden in Mengen von je einem Liter bei 6°C gelagert. Die gewonnenen Konidiensuspensionen wurden bei Versuchen zur Saatgut- und Bodenbehandlung im Gewächshaus verwendet.

**Flüssig-Gel:** Von der im Hirseflüssigmedium hergestellten Biomasse (Myzel, Chlamydosporen und Konidien) von *Trichoderma* wurden zu 100 ml gewünschter Konidienkonzentration jeweils 2 g Alginat Manutex (Fa. Kelco/AIL, Girvan, GB) zugegeben und eine Biomassealginatlösung nach KÖHL (1989) hergestellt. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 6°C gelagert und zur Samenbeizung benutzt.

**Hirsesamen:** 50 g Hirsesamen wurden vier Minuten mit 400 ml Leitungswasser gekocht, durch Autoklavieren sterilisiert und mit feuchtem Filterpapier zwischen Aluminiumfolien gelegt. Das Material wurde mit vier Stücken *Trichoderma*-Agarscheiben beimpft und bei 25°C inkubiert. Das Medium muß konstant feucht gehalten werden. Nach ca. zehn Tagen hat *Trichoderma* die Hirsesamen besiedelt und eine große Menge Biomasse gebildet. Die Masse wird langsam unter sterilen Bedingungen getrocknet. Auf diese Weise werden die Hirsekörner als Inokulumträger für *Trichoderma* produziert und in großen Mengen in Erlenmeyerkolben gelagert. Die Inokulumträger wurden in Mengen von 5, 10, 20, 30 Körnern je Topf angewendet.

### 2.2.6 Anwendungsverfahren von *Trichoderma* spp.

Bei den Versuchen zur biologischen Bekämpfung im Gewächshaus wurden *Trichoderma* spp. sowohl als Saatbeizungsmittel als auch für Bodeninokulationen verwendet. Zur Anwendung von *Trichoderma* spp. wurden verschiedene Trägersubstanzen in flüssigem, gelartigem oder festem Zustand getestet. Die Biomasse von *Trichoderma*, basierend auf verschiedenen Nährmedien, wurde auf ihr antagonistisches Potential sowohl im Labor und als auch im Gewächshaus geprüft.

**Saatgutbeizung:** Hierzu wurden die Samen von Bohnen und Kichererbsen mit der aus *T. harzianum* (T-040) gewonnenen Biomasse aus Agar- und Hirseflüssigmedien in Suspensionen von  $5 \times 10^5$  (TD1),  $5 \times 10^6$  (TD2) und  $2 \times 10^7$  (TD3) Konidien/ml eine Minute sowie eine, sechs und zwölf Stunden lang bei Raumtemperatur eingetaucht.

**Bodeninokulation:** Die aus den Agar- und Flüssigkulturmedien gewonnenen Biomassen von *Trichoderma*-Stämmen wurden unter Gewächshausbedingungen mit Wasser, Gelkugeln, Granulaten und Hirseseamen als Inokulumträgern zur Inokulation des Bodens verwendet und ihre Wirksamkeit zur biologischen Bekämpfung von *C. rolfii* getestet.

### 2.2.7 Inokulumgewinnung von *C. rolfii*

Unter Laborbedingungen wurde der Erreger *Corticium rolfii* (Cr2) durch regelmäßiges Übertragen auf frisches Nährmedium (PDA, MPA, PDYA) erhalten und bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

**Sklerotien:** Nach zwei Wochen produziert *C. rolfii* auf Agarkulturen eine große Zahl an Sklerotien (Sk1) von 0.5 mm-2 mm Durchmesser, die geerntet wurden und für eine Inokulation des Bodens bei Bohnen, Linsen und Kichererbsen im Gewächshaus verwendet wurden. Zuvor wurde die Keimungsfähigkeit der Sklerotien sowohl im Labor als auch im Gewächshaus getestet.

**Hirseseamen:** Hirseseamen (HCr2) wurden als Inokulumträger für *C. rolfii* benutzt. Die vier Minuten lang gekochten und sterilisierten Hirseseamen wurden mit Agarstücken (Ø 5 mm) von *C. rolfii* (Cr2) beimpft. Das inokulierte Material wurde auf Petrischalen oder sterilisierte Aluminiumfolie gestellt. Die Pilze bilden keine kompakte Masse von Myzel, sondern Granula. Auf diese Weise wurden – ähnlich wie bei *Trichoderma* spp. - große Mengen Inokulum hergestellt. Die Kulturen wurden bei 25°C inkubiert. Bei dieser Methode wachsen die Pilze sehr schnell und sind sehr aggressiv. Nach zwei Wochen kann das Material in sterile Erlenmeyerkolben übertragen und bei Zimmertemperatur gelagert werden. Vor dem Einsatz im Gewächshaus wurden die Keimfähigkeit und die Aggressivität der Inokulumträger geprüft.

### 2.2.8 Topfversuche

Die im Gewächshausversuch verwendeten Plastiktöpfe hatten einen Durchmesser von 12 cm. Als Boden wurde gedämpfte Komposterde LD-80 der Firma Archut GmbH verwendet. Je Topf wurden sechs Samen von Bohnen, Linsen und Kichererbsen ausgesät mit jeweils zehn Wiederholungen. Die Pflanzen standen bei 25°C und wurden konstant feucht gehalten. Die Auswertungen erfolgten im allgemeinen nach Anzahl aufgelaufener und gesunder Pflanzen je Topf nach 7 und 14 Tagen.

#### Inokulation des Bodens

Zur Durchführung der Versuche zur biologischen Bekämpfung von *C. rolfii* mußte zuerst bestimmt werden, ob die Infektionsverfahren mit Sklerotien (Sk1) oder Hirseseamen (HCr2) ausreichend wirksam sind, um Krankheitssymptome hervorzurufen. Dafür wurden Sklerotien (Sk1) in Mengen von 5, 10, 15, 20, 25, 50 und 100 je Topf mit 250g Erde und Hirseseamen (HCr2) von 5, 10, 20 je Topf als Inokulumträger getestet. Samen und Keimlinge von Bohnen,

Linsen und Kichererbsen wurden mit den ausgewählten Mengen des jeweiligen Inokulums von *C. rolfii* behandelt (Tab. 3).

**Tabelle 3: Inokulation des Bodens mit Sklerotien (Skl) und Hirsesamen (HCr<sub>2</sub>) als Inokulumträger von *C. rolfii* in verschiedenen Mengen**

Inokulummenge von <i>C. rolfii</i>	Kulturpflanze
Sklerotien: 5, 10, 15, 20, 25, 50 100 (Skl)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Lens culinaris</i> L.
Hirsesamen: 5, 10, 20 (HCr <sub>2</sub> )	<i>Cicer arietinum</i> L.

### Bekämpfung von *C. rolfii*

Bei den Inokulationsverfahren, bei denen Hirsesamen (H Cr<sub>2</sub>) verwendet wurde, wurde in den Versuchen 100 % Pflanzenmortalität erreicht. Auf diese Weise wurde die Inokulummenge des Pathogens für die Inokulation der Pflanzen bestimmt. Anschließend wurden Versuche zur biologischen Bekämpfung von *C. rolfii* durchgeführt. Hierfür wurden *Trichoderma* spp. vor und bei der Aussaat in verschiedenen Mengen und Konzentrationen untersucht (Tab. 4).

**Tabelle 4: Versuchsvarianten mit den jeweiligen Kontrollen**

<b>K1.</b>	Nur Samen
<b>K2.</b>	Samen mit <i>C. rolfii</i>
<b>K3.</b>	Samen mit <i>Trichoderma</i> spp.
<b>V1.</b>	Eine Woche vor Aussaat wurde <i>Trichoderma</i> in den Boden gegeben, bei der Aussaat wurden die Samen mit <i>C. rolfii</i> inokuliert.
<b>V2.</b>	Bei der Aussaat wurden die Samen mit <i>C. rolfii</i> und <i>Trichoderma</i> gemeinsam inokuliert.

**(K): Kontrolle**

**(V): Versuchsvarianten**

## 2.2.9 Rasterelektronenmikroskop

### Fixierung

Um zu prüfen, ob *Trichoderma* spp. beim Antagonismus-Test *C. rolfsii* abzutöten vermochte, wurden Agarscheiben (Ø 5 mm) aus der Stelle, an der Antagonist und Pathogen zusammengetroffen sind, nach 24 Stunden mit einem Kohrbohrer ausgestanzt.

Durchführung:

- Proben 6 x 10 Minuten in einer Lösung von Cacodylatpuffer-AquaBidest (0,1M; pH 7,2) auswaschen.
- Mit Aqua-Bidest 6 x 10 Minuten waschen.
- Proben in Ethylerglutaraldehyd einstellen, nach 2h wechseln (2 x) und über Nacht stehen lassen.
- Proben in 5 ml Aceton übertragen und in den Kühlschrank stellen, nach 1h wechseln und über Nacht stehen lassen.

### Kritisch-Punkt-Trocknung

Biologische Präparate, die mit einem Raster-Elektronenmikroskop untersucht werden sollen, müssen vor dem Einbringen in das Mikroskop getrocknet werden, sofern im Mikroskop-Objekt kein Kühltisch vorhanden ist. Damit wird eine Deformation oder Zerstörung der Struktur des Objektes durch die Oberflächenspannung vermieden (BÖHLER, 1985).

Durchführung:

- In der Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners werden die Proben in einen Metallbehälter gegeben und in einer aufsteigenden Aceton-Reihe entwässert. Die Druckkammer wird sorgfältig verschlossen.
- Durch mehrmaligen Austausch (3-5x) wird das Aceton durch flüssiges CO<sub>2</sub> ersetzt, dabei dürfen die Proben nicht austrocknen. Die Kammer wird ständig gekühlt. Beim letzten Austausch verbleiben die Proben für 10 Minuten in flüssigem CO<sub>2</sub>. Es ist zu beachten, daß das Aceton vor der Kritisch-Punkt-Trocknung restlos gegen CO<sub>2</sub> ausgetauscht werden muss.
- Die Trocknung der Proben findet bei 45°C und einem Druck von ca. 85 bar statt.
- Anschließend muß der Druck bei laufender Heizung langsam innerhalb von 10 Minuten 0 bar erreichen.
- Die getrockneten Proben werden auf Aluminiumobjektträgern mit doppelklebendem Band aufgeklebt und anschließend mit Gold 3 Minuten bei 0,6 mA beschichtet (besputtert).
- Anschließend sind die Proben fertig zur Beobachtung im REM.

### 2.2.10 Induzierte Resistenz

Für die Untersuchung der induzierten Resistenz gegen *C. rolfii* wurden Bohnen (*Phaseolus vulgaris* - Sorte "Saxa"); Linsen (*Lens culinaris*), Kichererbsen (*Cicer arietinum*), Erbsen (*Pisum sativum*) und Ackerbohnen (*Vicia fabae*) verwendet.

Zur Resistenzinduktion wurde der Wirkstoff Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-Methylester, BTH (**Abb. 4**) des kommerziellen Resistenzinduktors BION<sup>®</sup> (Novartis AG) in 50%iger Konzentration verwendet. Er aktiviert sowohl in monokotylen als auch in dikotylen Kulturpflanzen eine natürliche Resistenz gegen zahlreiche Schaderreger. Die empfohlene Aufwandmenge für Echten Mehltau an Getreide liegt bei 60 g/ha des Handelsproduktes.

Der Pflanzenresistenzaktivator BION<sup>®</sup>-Granulat (WG 50) wurde in den Konzentrationen 5, 10 und 20 und 40 µg a.i./ml bei Samen und Pflanzen mit verschiedenen Applikationstechniken getestet (**Tab. 5**).

Bei der Anwendung von BION<sup>®</sup>-Flüssig (100 EC) wurde geprüft, ob die Resistenz in Bohnen, Kichererbsen und Ackerbohnen gegen *C. rolfii* aktiviert wird. Dabei wurde BION<sup>®</sup> als Pflanzenaktivator in den Konzentrationen 12,5, 25, 50, 100 und 200 µg/ml in Mengen von 0,5 ml/100 g Samen verwendet (**Tab. 5**).

### Phytotoxizität

Da die Wirkung von BTH als Resistenzinduktor mit der Kulturpflanze variiert, wurden in den ersten Versuchen zur Resistenzinduktion sowohl BION<sup>®</sup>-Granulat (WG 50) als auch BION<sup>®</sup>-Flüssig (100 EC) in verschiedenen Dosierungen getestet. Das Ziel dieses Tests war zu untersuchen, welche Konzentrationen von der Pflanze ohne sichtbare Beeinträchtigung ertragen werden. Die ermittelten unschädlichen Konzentrationen sind in **Tab. 5** aufgeführt.

### Applikationsverfahren

Nach dem Phytotoxizitätstest wurden in den folgenden Versuchen ausgewählte wirksame Konzentrationen verwendet und gegen *C. rolfii* in verschiedenen Applikationsverfahren untersucht. Um die Wirksamkeit von BION<sup>®</sup> WG 50 und BION<sup>®</sup> 100 EC als Resistenzinduktor zu ermitteln, wurden Samen, Laubwerk und Boden mit den angegebenen Konzentrationen und Anwendungstechniken, wie in **Tab. 5** dargestellt, behandelt.



**Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen von BTH zur Durchführung des Phytotoxizitätstests und Ermittlung des Anwendungsverfahrens bei Kulturpflanzen**

Formulierung	Konzentrationstest	Anwendung	Kulturpflanzen
BION <sup>®</sup> WG 50	20-40 µg/ml	- Samen: Einquellen (1-12 Stunden)	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Lens culinaris</i> <i>Cicer arietinum</i>
	5-10-20-40 µg/ml	- Blätter: Spritzen	<i>Pisum sativum</i>
	20-40 µg/ml	- Bodenbehandlung (5, 10, 20 ml)	
BION <sup>®</sup> 100 EC	12,5-25-50-100-200 µg/ml	- Samen: Beizung (1-12 Stunden)	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Vicia faba</i> <i>Cicer arietinum</i>

### Induzierte Resistenz gegen *C. rolf sii*

Unter Gewächshausbedingungen wurden zahlreiche Versuche zur induzierbaren Resistenz gegen *C. rolf sii* durchgeführt. BION<sup>®</sup> WG 50 und BION<sup>®</sup> 100 EC wurden in den oben untersuchten Konzentrationen verwendet (s. Tab. 4).

Die Samen von Buschbohnen wurden mit BION<sup>®</sup> WG 50 in den Konzentrationen 20 und 40 µg a.i/ml getestet. Dazu wurden sie eine bis zwölf Stunden in den Lösungsvarianten von BION eingequollen. Die Wirkung auf die Keimfähigkeit und die Pflanzenhöhe wurde ermittelt.

Keimlinge wurden ca. eine Woche nach der Aussaat mit den Lösungsvarianten 5, 10 und 20 µg a.i/ml von BION<sup>®</sup> WG 50 gespritzt. Für diese Untersuchung wurden Buschbohnen, Linsen, Kichererbsen und Erbsen verwendet.

In weiteren Versuchen wurden 20 und 40 µg a.i/ml BION<sup>®</sup> WG 50 Lösungen in Mengen von 5, 10, und 20 ml vor dem Auflauf der Keimlinge in den Boden gegossen. Als eine andere Variante wurde der Boden nach dem Auflauf der Keimlinge behandelt. Für diese Versuche wurden Buschbohnen verwendet. Es wurde hier eine mögliche Phytotoxizität von BION ermittelt.

Die Anwendung von BION<sup>®</sup> 100 EC als Beizmittel wurde in den Konzentrationen 12,5, 25, 50, 100 und 200 µg/ml getestet. Buschbohnen-, Kichererbsen- und Ackerbohnen-Samen wurden zwischen einer Stunde bis zwölf Stunden mit allen Lösungsvarianten behandelt. Die Anwendungsmenge war 0,5 ml/100g Samen, die durch gründliches Schütteln gleichmäßig verteilt wurde.

In allen oben beschriebenen Anwendungsverfahren und getesteten Konzentrationen von BION<sup>®</sup> wurden diese mit den entsprechenden Kontrollen verglichen. Samen und Keimlinge wurden mit dem phytopathogenen Pilz *C. rolf sii* inokuliert. Die Inokulummenge von *C. rolf sii* variierte mit der Kulturpflanze (Tab. 6.). Das Inokulum des Pilzes wurde entweder zusammen

mit dem BION<sup>®</sup>-behandelten Samen oder getrennt auf die Fläche gegeben und leicht mit Erde bedeckt.

**Tabelle 6:** Verwendete Inokulummenge von *C. rolfii* bei der Inokulation im Boden oder an Keimlingen von Leguminosen. Als Inokulumträger von *C. rolfii* wurden Hirsesenamen verwendet.

Inokulummenge von <i>C. rolfii</i>	Kulturpflanze
5 x HCr <sub>2</sub>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
5 x HCr <sub>2</sub>	<i>Lens culinaris</i> L.
10 x HCr <sub>2</sub>	<i>Cicer arietinum</i> L.

(H)= pilzbewachsene Hirsekörner

### 2.2.11 Anlage der Topfversuche

Die in den Gewächshausversuchen verwendeten Plastiktöpfe hatten einen Durchmesser von 12 cm. Als Boden wurde gedämpfte Komposterde LD-80 der Firma Archut GmbH verwendet. Je Topf wurden sechs Samen von Buschbohnen, Linsen, Kichererbsen, Erbsen und Ackerbohnen ausgesät. Je Variante wurden 10 Wiederholungen angelegt. Die Pflanzen standen bei 25°C und wurden konstant feucht gehalten. Nach 7 und nach 14 Tagen wurde die Keimfähigkeit ermittelt und in einem Zeitraum von 4 Wochen die Pflanzenhöhe gemessen.

### 2.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmpaketes SPSS, Version 5.0, 7.5, 8.0 und 9.0 und MSTAT-C durchgeführt. Es konnte eine einfaktorielle und mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt werden, wenn zwei Voraussetzungen erfüllt waren: Daten normalverteilt, Varianzenhomogenität. Bei Daten, die nicht normalverteilt oder varianzhomogen waren, erfolgte die Varianz-analytische Berechnung mit dem Median-Test. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von P=0.05 bestimmt und durch entsprechende Buchstaben in den Tabellen und Graphiken dargestellt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Wachstum von *Corticium rolfii* in vitro

Es wurden zwei Stämme des Pathogens *Corticium rolfii* (Cr1 und Cr2) getestet, die aus den tropischen Gebieten Indiens stammen und in der Pilzesammlung des Instituts vorhanden waren. Das Wachstum des Erregers wurde auf PDA-, PDYA-, MPA- und GHA-Medium unter Laborbedingungen (ca. +/- 25 °C) ermittelt. Dabei wurde neben dem Wachstum auch die Bildung von Sklerotien beobachtet.

**Tab. 7: Wachstumsrate der Kulturdurchmesser von *C. rolfii* (Cr1) und (Cr2) auf verschiedenen Agarmedien bei 25 °C**

Nährmedien	Cr1 Wachstumsrate (mm/24h) bei 25°C	Cr2 Wachstumsrate (mm/24h) bei 25°C
PDA	21,0 a (+++)	21,0 a (+++)
MPA	20,25 a (++)	20,25 a (++)
PDYA	20,25 a (+++)	20,60 a (+++)
GHA	14,75 b (+)	15,25 b (+)

(+++) **Sehr große Anzahl von Sklerotien**

(++) **Große Anzahl von Sklerotien**

(+) **Geringe Anzahl von Sklerotien**

**Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P = 0.05)**

Beide Isolate von *C. rolfii* (Cr1 und Cr2) zeigten gleiches Wachstum auf den Medien PDA, MPA und PDYA, nur auf GHA war die Entwicklung signifikant geringer. Entsprechend war auch die Anzahl gebildeter Sklerotien (**Abb. 6**) auf GHA deutlich niedriger als auf den anderen Medien.



Abb 6. Sklerotien von *C. rolfii* (Cr2) auf PDA

### 3.2 Wachstum und Sporulation von *Trichoderma* spp. *in vitro*

Das Wachstum von *Trichoderma* auf den verschiedenen Nährmedien unterscheidet sich signifikant (Tab. 8). Allgemein haben die Pilze auf PDA eine durchschnittliche Wachstumsrate von 24,20 mm/24h, gefolgt von PDYA mit 22,54 mm/24h und MPA (22,03 mm/24h). Auf GHA beträgt das Wachstum nur 18,17 mm/24h. Innerhalb der einzelnen Gruppen unterscheidet sich das Wachstum der Pilze ebenfalls signifikant. Morphologische Eigenschaften, wie z.B. die Farbe des Myzels und der Sporulation, können beträchtlich variieren. *Trichoderma*-Stämme sporulierten auf PDA und PDYA deutlich stärker als auf MPA und GHA. Auf GHA wachsen *Trichoderma* spp. zwar schnell, das gebildete Myzel ist jedoch sehr schwach, farblos und zeigt keine Sporulation. Für die Anzucht der Pilze ist das GHA-Medium weniger geeignet.

**Tab. 8:      Durchschnittliches Wachstum des Kulturdurchmessers von *Trichoderma*-Stämmen auf einem Medium bei 25 °C**

<b>PDA (24,20) a</b>		<b>PDYA (22,54) b</b>		<b>MPA (22,03) c</b>		<b>GHA (18,17) d</b>	
Pilze	Wachstum mm/24h	Pilze	Wachstum mm/24h	Pilze	Wachstum mm/24h	Pilze	Wachstum mm/24h
T-309	28,00 <b>a</b>	T-165 (+)	28,00 <b>a</b>	T-309	27,89 <b>a</b>	T-309	23,77 <b>a</b>
T-165 (+)	27,55 <b>a</b>	T-040 (+)	27,77 <b>a</b>	T-165 (+)	27,00 <b>ab</b>	T-165	22,66 <b>b</b>
T-171	27,22 <b>ab</b>	T-309	26,72 <b>b</b>	T-040 (+)	26,44 <b>ab</b>	T-093	22,33 <b>bc</b>
T-040 (+)	27,11 <b>ab</b>	T-166	25,77 <b>b</b>	T-093	25,89 <b>bc</b>	T-171	21,44 <b>c</b>
T-116	25,66 <b>bc</b>	T-093	24,00 <b>bc</b>	T-116	24,44 <b>cd</b>	T-166	21,33 <b>cd</b>
T-166	25,11 <b>c</b>	T-116	23,11 <b>c</b>	T-171	23,77 <b>de</b>	T-257	20,33 <b>de</b>
T-093	24,77 <b>c</b>	T-171	23,00 <b>c</b>	T-257 (+)	23,55 <b>de</b>	T-024	20,22 <b>e</b>
T-257 (+)	24,22 <b>c</b>	T-024	20,00 <b>d</b>	T-024	23,33 <b>de</b>	T-116	18,00 <b>f</b>
T-024	22,33 <b>d</b>	T-257 (+)	19,55 <b>de</b>	T-166	23,00 <b>de</b>	T-391	17,33 <b>f</b>
T-391 (*)	21,44 <b>de</b>	T-391 (*)	17,77 <b>e</b>	T-391 (*)	22,33 <b>f</b>	T-040	13,77 <b>g</b>

(+) *Trichoderma* sporuliert grün.

(\*) *Trichoderma* sporuliert weiß.

**T-309** *Trichoderma hamatum* Bon.

**T-165** *Trichoderma koningii* Oud.

**T-171** *Trichoderma harzianum* Rifai.

**T-040** *Trichoderma harzianum* Rifai.

**T-116** *Trichoderma koningii* Oud.

**T-166** *Trichoderma hamatum* Bon.

**T-093** *Trichoderma hamatum* Bon.

**T-257** *Trichoderma harzianum* Rifai.

**T-024** *Trichoderma hamatum* Bon.

**T-391** *Trichoderma harzianum* Rifai.

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05)

*Trichoderma*-Stämme können auf PDA, PDYA und MPA ohne Schwierigkeiten wachsen, wobei Farbe und Sporulation auf PDA und PDYA am besten ausgeprägt sind (Tab. 8). *Trichoderma*-Pilze, die auf PDA und MPA dunkel-grün sporulieren, wie z.B. T-165, T-040, T-257, zeigen eine gelbe und weiße Farbe und Sporulation auf PDYA. Bei T-391 und T-093 ist das Myzel und die Sporulation auf den meisten Medien weiß-creme-farben.

**Tab. 9: Myzelfärbung und Sporulation von *Trichoderma*-Stämmen auf verschiedenen Nährmedien**

PILZE	PDA		PDYA		MPA		GHA	
	Farbe	Sporulation	Farbe	Sporulation	Farbe	Sporulation	Farbe	Sporulation
T-309	weiß	++	creme	+++	weiß	++	weiß	-
T-165	gelblich	+++	gelblich	+++	gelb	++	weiß	-
T-171	braun	+	braun	++	braun	+	braun	-
T-040	grün-weiß	+++	grün-gelb	+++	grün	++	weiß	+
T-116	grün-	++	weiß-grün	++	grün	++	weiß	-
T-166	weiß	+	weiß	+	weiß	+	weiß	-
T-093	weiß	+	weiß	+++	creme	++	creme	-
T-257	grün-weiß	+++	grün-weiß	+++	weiß	++	weiß	-
T-024	weiß	++	weiß-creme	+++	creme	++	weiß	-
T-391	creme	++	creme	+++	weiß-grün	++	braun	-

(+++) **Sehr starke Sporulation**

(++) **Starke Sporulation**

(+) **Schwache Sporulation**

(-) **Keine Sporulation**

*Trichoderma* spp. weisen auf PDA- und PDYA-Medien eine höhere Anzahl von Konidien auf. Das Wachstum, die Sporulation und die Färbung der Pilze ist von den Nährmedien abhängig. Dabei spielen Temperatur und Dauer der Inkubationszeit eine Rolle. Im allgemeinen wurde gefunden, daß die meisten *Trichoderma* spp. eine Temperatur von +/- 25 °C und eine Inkubationsdauer von 5 bis 10 Tagen benötigen, um die höchste Sporulation zu erreichen. Bei Temperaturänderungen reagieren die meisten *Trichoderma*-Stämme nicht nur beim Wachstum und Sporulation, sondern auch in bezug auf ihr Antagonismuspotential ganz unterschiedlich.

### 3.3 Fungizidempfindlichkeit

Die Bekämpfung von Pflanzenkrankheitserregern wird in modernen Anbausystemen durch Applikation von synthetischen Fungiziden durchgeführt. Da diese aufgrund ihres großen Wirkungsspektrums auch gegen andere Organismen wirken, wurde *in vitro* die Wirkung einiger Fungizide auf *Trichoderma*-Stämme untersucht.

#### Wirkung von Benomyl auf *Trichoderma* spp. und *C. rolsii* im Agarschalentest

Resistenzprüfungen von *Trichoderma* spp. und *C. rolsii* gegenüber dem Fungizid Benomyl wurden in niedrigen und hohen Konzentrationen im Agarschalentest durchgeführt (Tab. 10). Dabei sollten *Trichoderma*-Stämme, die gegen hohe Fungizidkonzentrationen resistent sind, selektiert werden. Solche *Trichoderma* spp., die eine geringe Empfindlichkeit aufweisen, könnten zur Entwicklung integrierter Bekämpfungsmethoden verwendet werden. Von den 10 geprüften *Trichoderma* spp. reagierten 9 sehr empfindlich auf Benomyl. Nur T-391, ein Isolat von *T. harzianum*, erwies sich als sehr widerstandsfähig und konnte bei 50 µg Benomyl a.i./ml noch ungehemmt wachsen. Beide Isolate von *C. rolsii* (Cr1, Cr2) vertragen 25 µg Benomyl/ml ohne Beeinträchtigung ihres Wachstums.

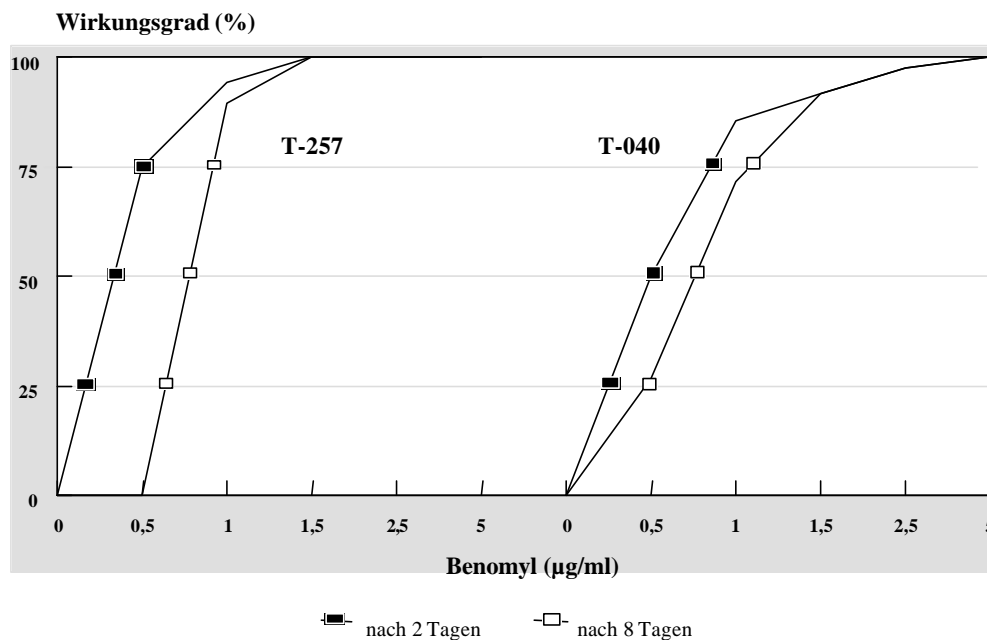
**Tab. 10: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolfii* (Cr1 und Cr2) gegen Benomyl**

PILZ	Wirkung von Benomyl µg a.i. /ml auf <i>Trichoderma</i> spp. und <i>C. rolfii</i>							
	0	5	10	15	20	25	50	100
T-309	+	-	-	-	-	-	-	-
T-165	+	-	-	-	-	-	-	-
T-171	+	-	-	-	-	-	-	-
T-040	+	-	-	-	-	-	-	-
T-116	+	-	-	-	-	-	-	-
T-166	+	-	-	-	-	-	-	-
T-093	+	*	-	-	-	-	-	-
T-257	+	-	-	-	-	-	-	-
T-024	+	-	-	-	-	-	-	-
T-391	+	+	+	+	+	+	+	*
Cr1	+	+	+	+	+	+	*	*
Cr2	+	+	+	+	+	+	*	*

+      **Starkes Wachstum**  
 \*      **Schwache Wachstumshemmung**  
 -      **Starke Wachstumshemmung**

Trotz ihrer hohen Empfindlichkeit gegen Benomyl wurden vier Stämme - T-257, T-040, T-165 und T-093 - aufgrund ihrer antagonistischen Fähigkeiten für weitere Resistenzuntersuchungen ausgewählt und bei niedrigen Konzentrationen von Benomyl weiter untersucht. Dabei wurden die ED<sub>25</sub>- ED<sub>50</sub>- und ED<sub>75</sub>- Werte bestimmt. Die Wirksamkeit des Fungizids auf das Wachstum der selektierten *Trichoderma* T-257 und T040 wird in **Abb. 7** gezeigt. In **Tab. 11** sind die ED<sub>25</sub>- ED<sub>50</sub>- und ED<sub>75</sub>- Werte aufgeführt. Die Ergebnisse für T-165 und T-093 werden in **Abb. 8** und in **Tab. 12** dargestellt. Der Wirkungsgrad von Benomyl für den resistenten T-391 und die Pathogene Cr1 und Cr2 wird in **Abb. 9** und in **Tab. 13** aufgeführt.





**Abb. 7:** Wirkungsgrad von Benomyl in niedrigen Konzentrationen gegen die *Trichoderma*-Stämme T-257 und T-040 zwei und acht Tage nach dem Überimpfen

**Tab. 11:** ED<sub>25</sub>- ED<sub>50</sub>- und ED<sub>75</sub>- Werte für Abb. 7

T-257	ED25	ED50	ED75
Nach zwei Tagen	0,15	0,35	0,55
Nach acht Tagen	0,48	0,78	1,10
T-040			
Nach zwei Tagen	0,25	0,50	0,87
Nach acht Tagen	0,47	0,77	0,97

Benomyl wirkte sehr stark auf das Myzelwachstum von *Trichoderma* T-257 und T-040. Beide Stämme reagieren gleichermaßen sehr empfindlich auf niedrige Konzentrationen und unterscheiden sich nur gering.

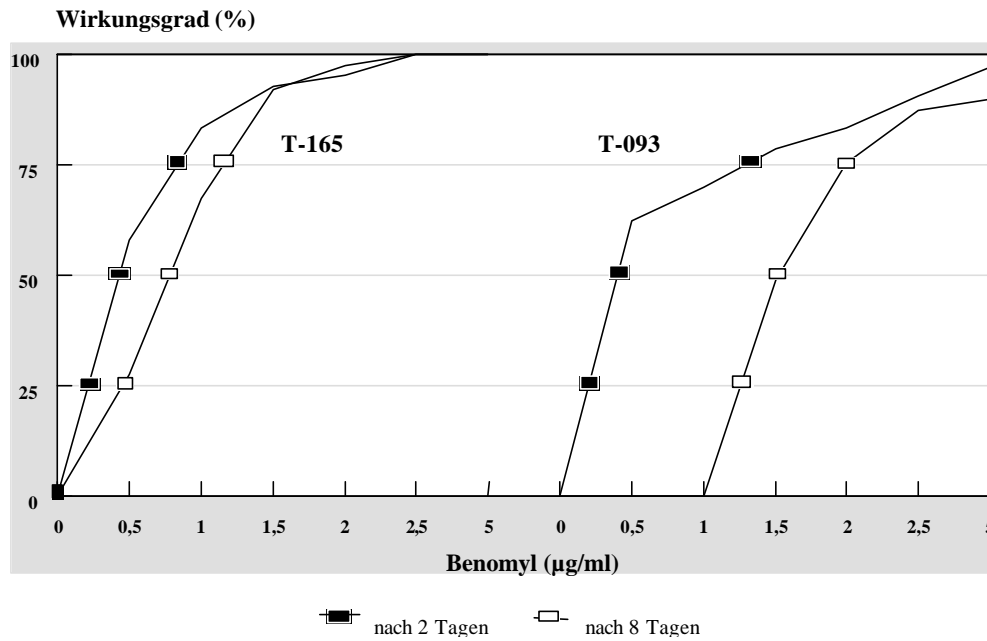
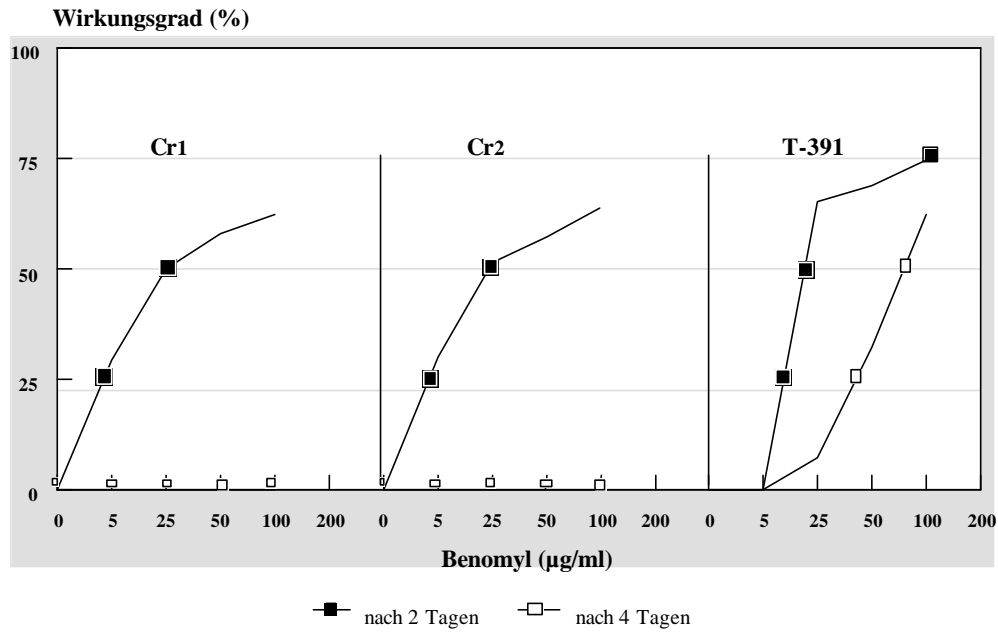


Abb. 8: Wirkungsgrad von Benomyl in niedrigen Konzentrationen gegen die *Trichoderma*-Stämme T-165 und T-093 zwei und acht Tage nach dem Überimpfen

Tab. 12: ED<sub>25</sub>- ED<sub>50</sub>- und ED<sub>75</sub>- Werte für Abb. 8

T-165	ED25	ED50	ED75
Nach zwei Tagen	0,22	0,42	0,72
Nach acht Tagen	0,45	0,80	1,15
T-093	ED25	ED50	ED75
Nach zwei Tagen	0,20	0,40	1,35
Nach acht Tagen	1,27	1,55	1,95

Benomyl hemmt das Myzelwachstum von T-165 stärker als das von T-093. Die notwendigen Konzentrationen, um einen Wirkungsgrad von 75% zu erreichen, lagen für T-165 bei 1,15 µg/ml und für T-093 bei 1,95 µg/ml.



**Abb. 9:** Wirkungsgrad von Benomyl in hohen Konzentrationen gegen *Corticium rolfsii* (Cr1 und Cr2) und den resistenten Stamm T-391 zwei und acht Tage nach dem Überimpfen

**Tab. 13:** ED<sub>25</sub>- ED<sub>50</sub>- und ED<sub>75</sub>- Werte für Abb. 9

Cr1	ED25	ED50	ED75
nach zwei Tagen	4,5	50	100
nach acht Tagen	0	0	0
Cr2	ED25	ED50	ED75
nach zwei Tagen	4,2	50	100
nach acht Tagen	0	0	0
T-391	ED25	ED50	ED75
nach zwei Tagen	12,7	20,5	100
nach acht Tagen	43	74	100

Zwischen den pilzlichen Pathogenen Cr<sub>1</sub> und Cr<sub>2</sub> gib es kaum Unterschiede (Abb. 9). Beide Isolate sind unempfindlich gegen den Wirkstoff Benomyl bei Konzentrationen von 5 bis 100 µg/ml. Beim Stamm *Trichoderma* T-391 lag eine bestimmte Resistenz gegen Benomyl vor. Im Laufe verschiedener Versuche konnte beobachtet werden, daß T-391 auch bei ca. 100 µg/ml wachsen kann, die Entwicklung verläuft dann jedoch unregelmäßig.

### **Wirkung von Fungiziden auf *Trichoderma* spp. und *C. rolfii* im Agarschalentest**

Zur Bekämpfung von Krankheitserregern an Kulturpflanzen werden normalerweise mehrere Fungizide mit unterschiedlichen Wirkstoffgruppen appliziert. Es wurde daher der Einfluß von Fungiziden auf das Wachstum von *Trichoderma* und *C. rolfii* unter Laborbedingungen untersucht. Dabei wurde die Fungizidempfindlichkeit von *T. harzianum* (T-040) und (T-257) sowie *T. koningii* (T-165) und dem Pathogen *C. rolfii* gegen Benomyl, Prochloraz, Vinclozolin, Triadimefon und Triadimenol ermittelt (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13) und deren Wirkung nach 4, 16 und 32 Tagen ausgewertet. Im allgemeinen wirkten die Fungizide Triadimenol, Triadimefon und Vinclozolin nicht auf das Myzelwachstum der *Trichoderma*-Stämme. Es wurde beobachtet, daß die Pilze nach vier Tagen fast 100% ihres Wachstums erreicht haben. T-040 und T-165 waren bei über 20 µg/ml empfindlich gegen Prochloraz und hatten nach 32 Tagen nicht einmal 50% ihres Wachstums erreicht. Im Gegensatz dazu zeigte T-257 eine Resistenz gegenüber Prochloraz. *C. rolfii* zeigte eine Resistenz gegen Vinclozolin, d.h. es gab keine Wachstumshemmung des Pilzes, der schon nach 16 Tagen 100% seines Wachstums erreicht hatte, d.h. die Agarschale voll ausgefüllt war. Das Myzelwachstum von Cr<sub>2</sub> wurde ab 25 µg/ml Prochloraz bis 32 Tage nach der Beimpfung sehr stark gehemmt. Dies konnte auch bei Triadimenol und Triadimefon festgestellt werden. Eine gute Kompatibilität von *Trichoderma*-Stämmen und Fungiziden bedeutet, daß die Wirkstoffe der Fungizide bei den angewandten Mengen keine Wirkung auf die Entwicklung von *Trichoderma* zeigen, womit gewährleistet ist, daß die Pilze in einem integrierten Bekämpfungsverfahren trotz des Vorhandenseins eines bestimmten Fungizids wachsen können.

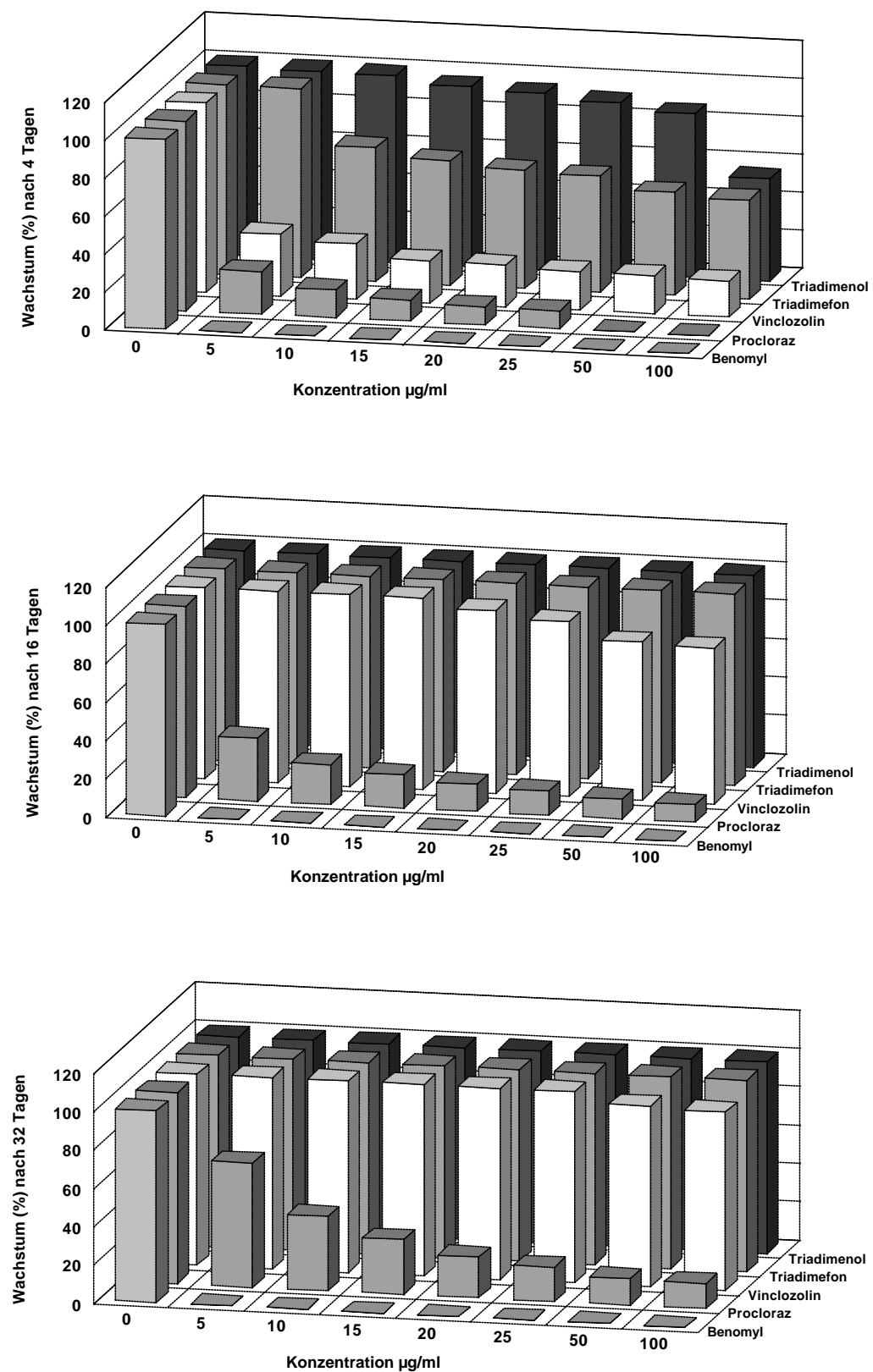


Abb. 10: Wirkung von Fungiziden auf den radialen Myzelzuwachs von *Trichoderma harzianum* (T-040) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle *in vitro* bei 25 °C

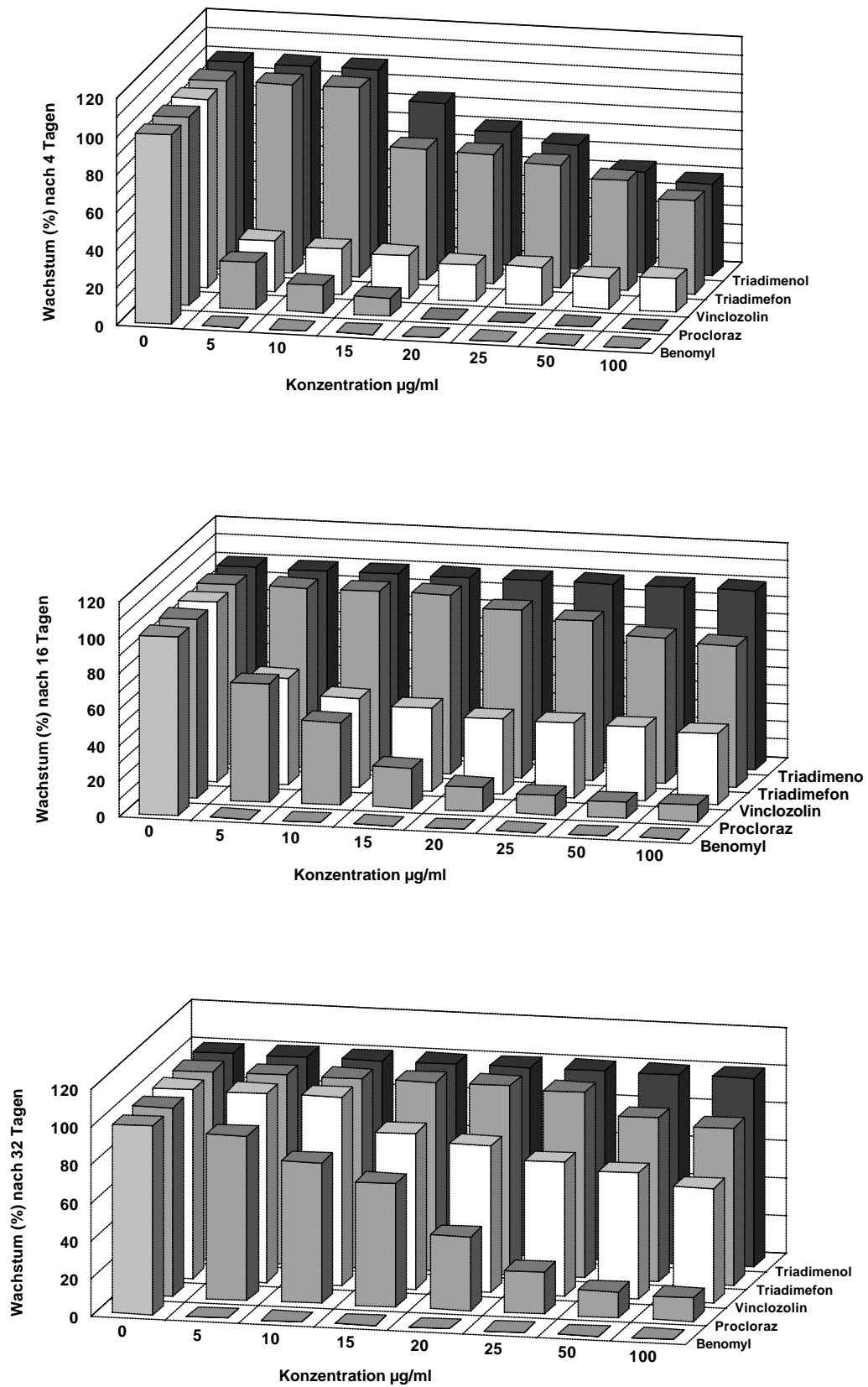


Abb. 11 Wirkung von Fungiziden auf den radialen Myzelzuwachs von *Trichoderma koningii* (T-165) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle *in vitro* bei 25 °C

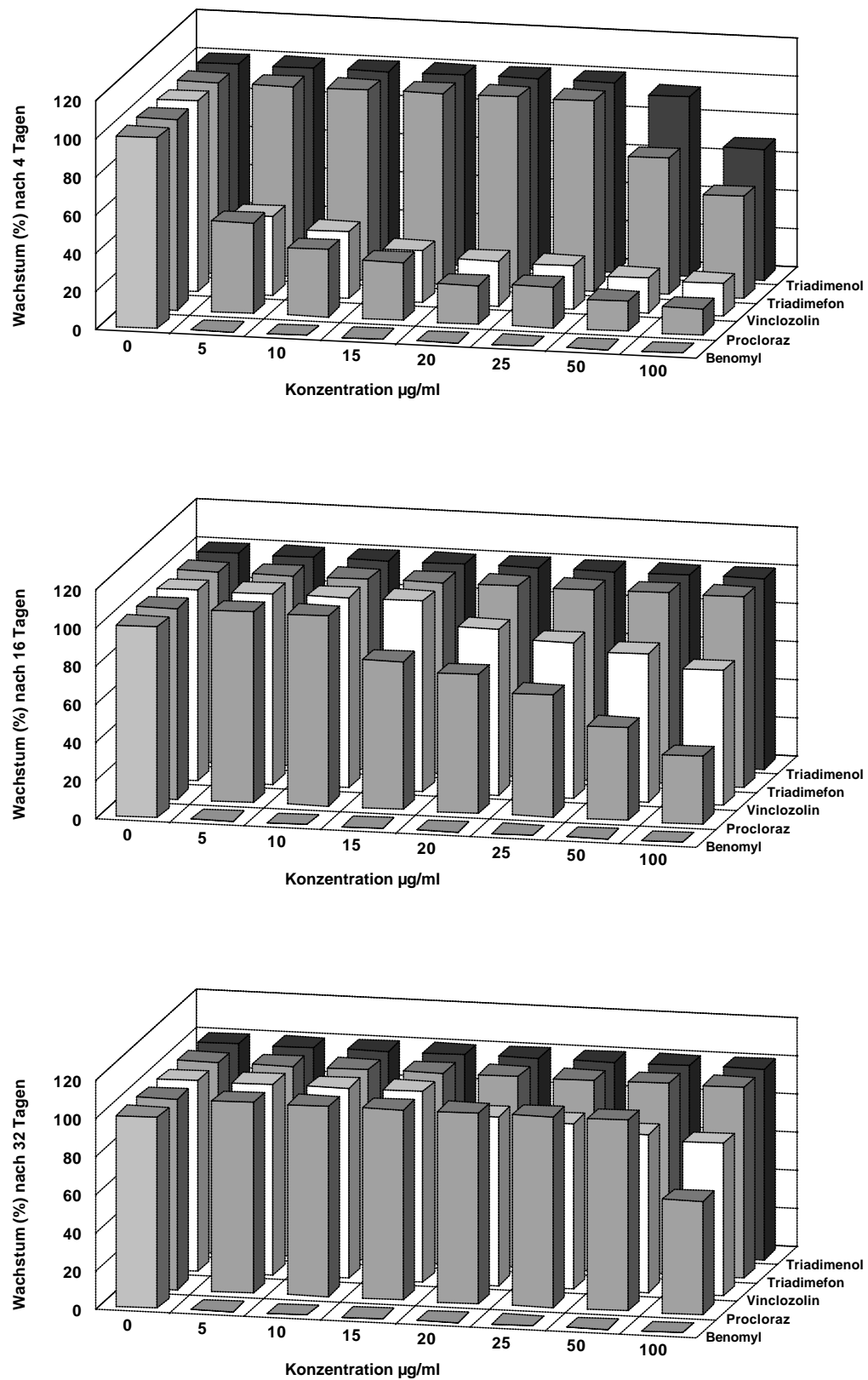


Abb. 12: Wirkung von Fungiziden auf den radialen Myzelzuwachs von *Trichoderma harzianum* (T-257) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle *in vitro* bei 25 °C

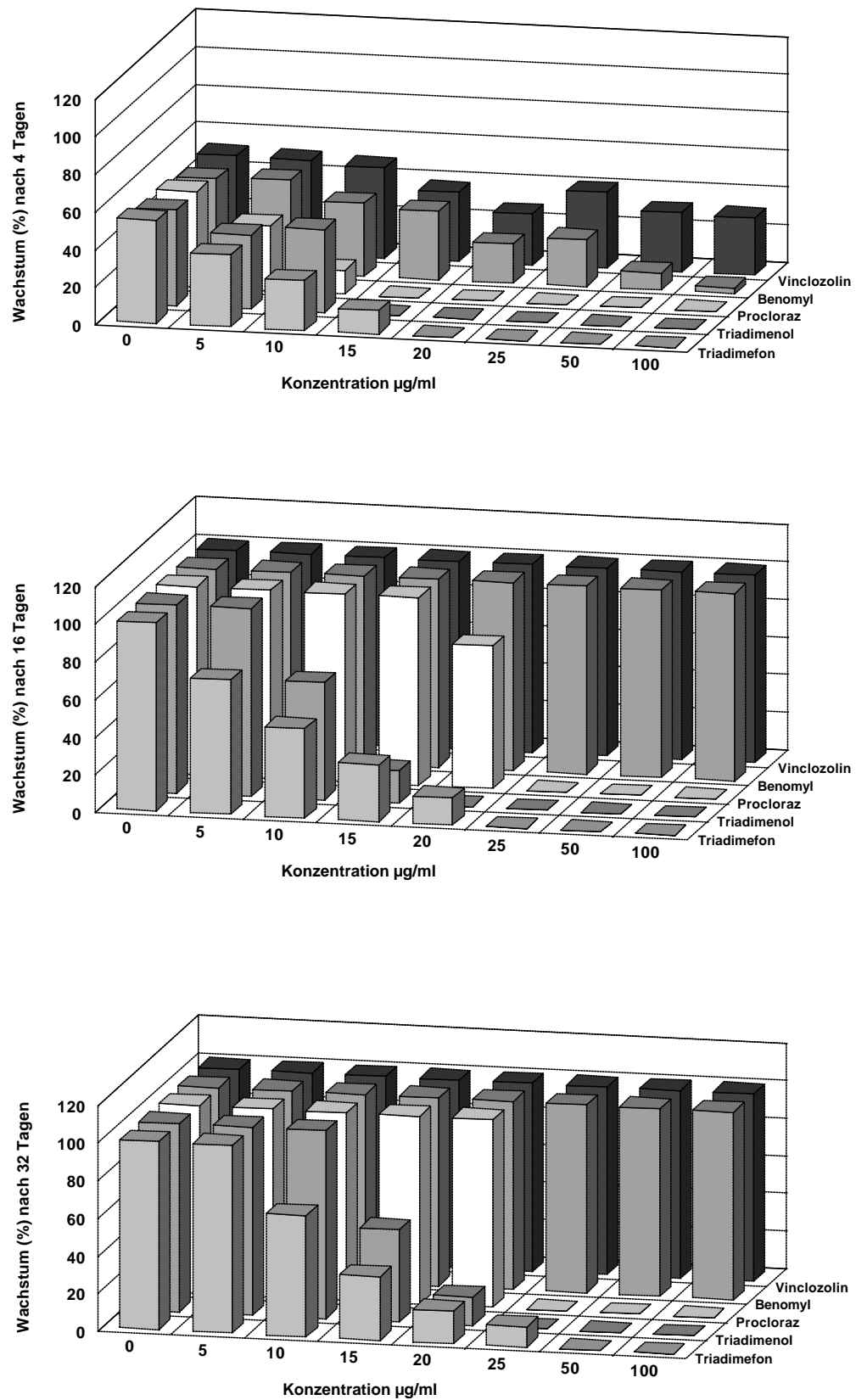


Abb. 13: Wirkung von Fungiziden auf den radialen Myzelzuwachs von *Corticium rolfsii* (Cr<sub>2</sub>) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle *in vitro* bei 25 °C



### 3.4 Antagonismus von *Trichoderma* spp. *in vitro*

#### 3.4.1 Dualkultur

Es wurden *Trichoderma*-Stämme unter Laborbedingungen auf ihre Wirkung als Antagonisten gegen *C. rolfii* (Cr<sub>1</sub> und Cr<sub>2</sub>) getestet. Da die verantwortlichen Mechanismen des Antagonismus von *Trichoderma* spp. mit dem Ernährungszustand des Pilzes korrelieren, wurden die *Trichoderma*-Stämme und die Pathogene in Dualkulturen auf verschiedenen Nährmedien angelegt. Dabei wurde beobachtet, daß die Fähigkeit von *Trichoderma* spp., das Myzelwachstum des Pathogens zu hemmen bzw. das Myzel zu überwachsen und abzutöten, stark von der Art des Nährmediums bestimmt wird (Tab. 14). So ist der Antagonismus auf PDYA und PDA besonders ausgeprägt. MPA ist weniger geeignet und auf GHA sind ausscheinend überhaupt keine antagonistischen Interaktionen vorhanden. Neben der Art des Nährmediums ist die Art bzw. der Stamm einer *Trichoderma* spp. von entscheidender Bedeutung. Ist ein Pilz auf einem Medium ein starker Antagonist, so gilt das auch für andere Medien (T-165, T-040, T093). Ist das Antagonismuspotential schwach (T-309, T-024) oder kaum vorhanden (T-171, T-116, T-166), so gilt dies für alle Medien.

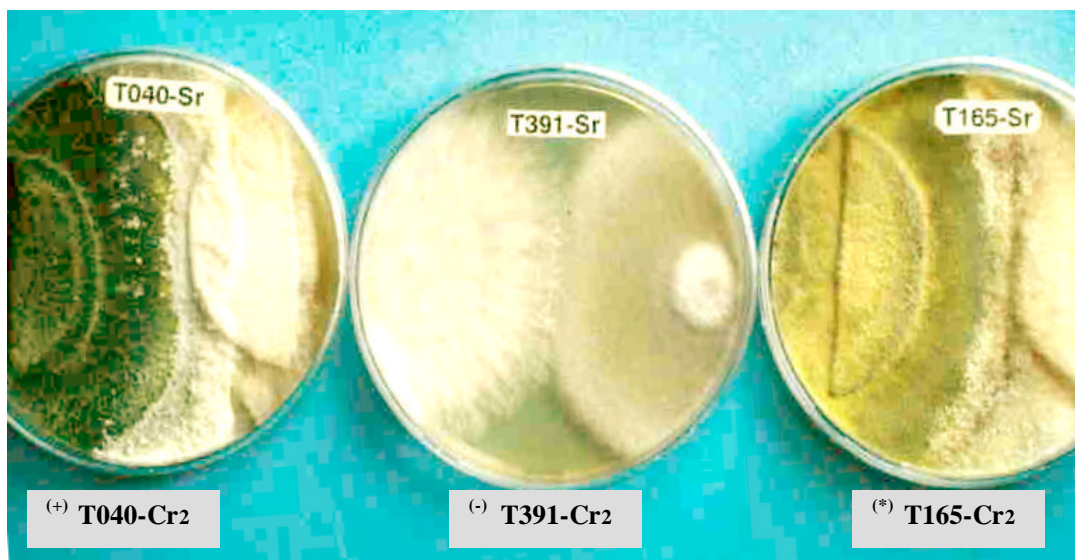


Abb. 14 Dualkultur zum Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* auf PDA

T-040 *Trichoderma harzianum* Rifai.

T-391 *Trichoderma harzianum* Rifai.

T-165 *Trichoderma koningii* Oud.

(+) *Trichoderma* sporuliert grün-weiß, ist aggressiv und überwächst.

(-) *Trichoderma* sporuliert weiß-cremefarben, keine Überwachtung

(\*) *Trichoderma* sporuliert grün-gelb, ist aggressiv und überwächst.

**Tab. 14:** Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfsii* (Cr1- Cr2) auf verschiedenen Nährmedien

PILZE	PDA		PDYA		MPA		GHA	
	Cr1	Cr2	Cr1	Cr2	Cr <sub>1</sub>	Cr <sub>2</sub>	Cr1	Cr2
T-309	+	+	+	+	-	-	*	*
<b>T-165</b>	+++	+++	+++	+++	++	++	*	*
T-171	-	-	-	-	-	-	*	*
<b>T-040</b>	+++	+++	+++	+++	++	+	*	*
T-116	-	-	-	-	-	-	*	*
T-166	-	-	-	-	-	-	*	*
<b>T-093</b>	++	++	+++	+++	+	+	*	*
<b>T-257</b>	++	++	++	++	+	+	*	*
T-024	+	+	+	+	+	+	*	*
<b>T-391</b>	++	++	++	++	+	+	*	*

(+++) **Sehr starker Antagonismus (*Trichoderma* überwächst den Pathogen schnell)**

(++) **Starker Antagonismus (*Trichoderma* überwächst den Pathogen langsam)**

(+) **Schwacher Antagonismus (*Trichoderma* und der Pathogen haben Kontakt, es tritt aber keine Überwachsung auf)**

(\*) ***Trichoderma* und der Pathogen haben keinen Kontakt, es entsteht eine Trennungslinie**

(-) **Kein Antagonismus (der Pathogen überwächst *Trichoderma*)**

Das Überwachsen des Pathogens durch eine *Trichoderma* spp. bedeutet nicht unbedingt, daß der Erreger abgetötet wurde. Zur Klärung dieser Frage wurden mit einem Korkbohrer Agarstücke aus den Überwachstumszonen (+++ oder ++) ausgestanzt und auf ein Selektivmedium übertragen, auf dem das Wachstum von *Trichoderma* spp. weitgehend gehemmt wird, *C. rolfii* aber ungehemmt wachsen kann.

Mit diesem System kann sicher geprüft werden, ob *C. rolfii* durch eine *Trichoderma* spp. abgetötet oder nicht angegriffen worden ist. Bei den benomyl-resistenten T-391 war mit dem benomyl-haltigen (15 µg/ml) Medium keine klare Differenzierung möglich. Zwei Stämme (T-040, T-165) haben den Pathogen abgetötet (Tab. 15), während T-093 und T-257 nur ein geringes antagonistisches Potential gegen *C. rolfii* haben.

**Tab. 15:** Antagonistische Wirkung von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* auf PDYA mit 15 µg a.i Benomyl/ml

<i>Trichoderma</i>	<i>C. rolfii</i>	
	Cr1	Cr2
<b>T-040</b>	(+)	(+)
<b>T-391</b>	(*)	(*)
<b>T-093</b>	(-)	(-)
<b>T-165</b>	(+)	(+)
<b>T-257</b>	(-)	(-)

(+) Erreger wird abgetötet

(\*) Wachstum von *Trichoderma* spp.

(-) Wachstum des Erregers

(T040) *Trichoderma harzianum* Rifai.

(T391) *Trichoderma harzianum* Rifai.

(T093) *Trichoderma hamatum* Bon.

(T165) *Trichoderma koningii*

(T257) *Trichoderma harzianum* Rifai.

In weiteren Versuchen wurde das Verhalten von *Trichoderma* Stämmen gegen andere wichtige Krankheitserreger in Dualkulturen auf PDYA getestet, in Selektivmedien wurde aber keine Wirkung von *Trichoderma* nachgewiesen (Tab A12; Tab A14).

### 3.4.2 Antagonismus von *Trichoderma* spp. unter dem Rasterelektronenmikroskop

Nach der Untersuchung und Bewertung der Antagonismusfähigkeit von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfsii* in Dualkulturen wurden von der Überwachstumszone, d.h. von der Stelle, an der *Trichoderma* und *C. rolfsii* zusammengetroffen sind, mit dem Korkbohrer einige Agarscheiben (Ø 5 mm) ausgestanzt und nach der Fixierung- (2.2.1.14.1) und Trocknung der Proben (2.2.1.14.2) die verantwortlichen Mechanismen des Antagonistes mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Es wurde beobachtet, daß *Trichoderma* spp. die Eigenschaft haben, während des Wachstums sowohl Phialiden, Sporen als auch Chlamydosporen zu bilden, ein Mechanismus, der auf einer Konkurrenz um Nahrung und Raum beruht, wodurch das Wachstum von *C. rolfsii* unterdrückt wird (Abb. 15A, 15B). Während der Interaktion von *Trichoderma* und *C. rolfsii* ist der Parasitismus eine weitere Möglichkeit des Antagonists, die Schaderreger abzutöten. Die Hyphen von *Trichoderma* spp. bilden appressorienähnliche Strukturen, die sich fest an die Oberfläche des Wirts anheften (Abb. 15C). Als weiteres Zeichen der Parasitierung die Hyphen von *C. rolfsii* festhalten (Abb. 15D, 15E) und umwinden (Abb. 15F und Abb. 1), ein Vorgang, der coiling genannt wird. Im Anschluß an das coiling dringt der Antagonist in die Hyphen des Pathogens ein und breitet sich weiter aus (Abb. 15G). Der Prozeß des Mycoparasitismus von *Trichoderma* wird durch den Efflux des Cytoplasmas und den Abbau der Zellwand des Wirts beendet. Der Abbau läuft während des Kontakts mit *Trichoderma* und mit Hilfe ausgeschiedener hydrolytischer Enzyme ab (Abb. 15H).

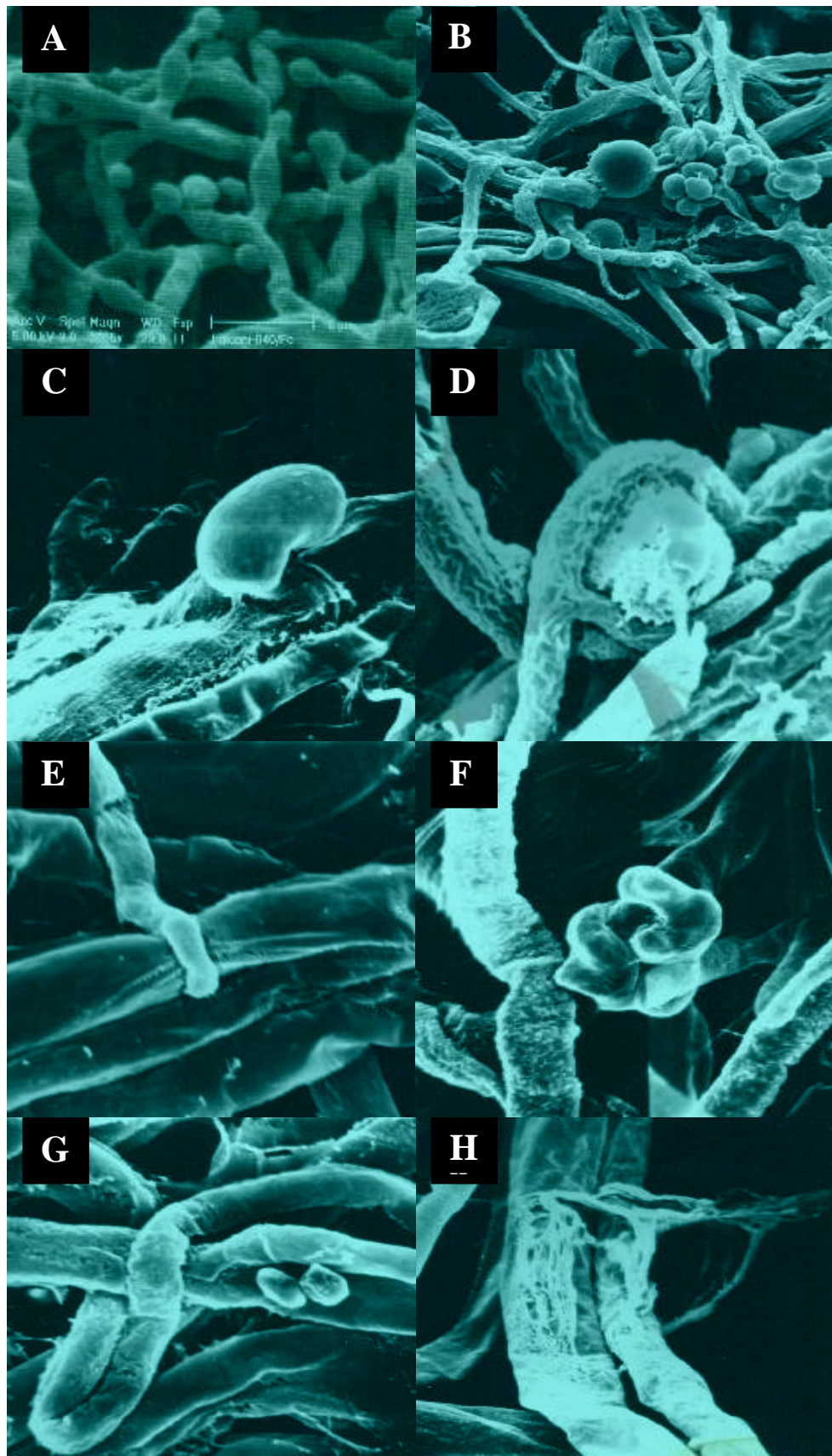


Abb. 15. Untersuchung des Antagonismus von *T. harzianum* T-040 unter Rasterelektronenmikroskop. 15A: Phialiden (3865x); 15B: Sporen und Chlamydosporen (4200x); 15C: Bildung von appressorienähnlichen Strukturen (2800x); 15D (2200x), 15E (1750x): Festhalten der Hyphen von *C. rolfii*. 15F (1800x); 15G (1750x) Eindringen in die Hyphen des Pathogens. 15H (1800x): Anschließender Efflux des Cytoplasmas und Abbau der Zellwand des Wirts.

### 3.4.3 Wachstumshemmung volatiler Stoffe von *Trichoderma*

Die Bildung von Stoffwechselprodukten - sowohl volatilen als auch nicht - volatilen Substanzen – ist einer der möglichen Mechanismen, mit deren Hilfe *Trichoderma* das Wachstum anderer Pilze hemmt. Um zu überprüfen, ob *Trichoderma* spp. in der Lage sind, solche wirksamen Substanzen zu bilden, wurden verschiedene Stämme ausgewählt und sowohl in Erlenmeyerkolben als auch in Dualkulturen verschiedener älterer Inokulationskulturen getestet.

#### Wachstumshemmung von *Trichoderma* spp. im Kolben

*Trichoderma*-Stämme wurden auf PDYA-Nährmedien im Kolben inokuliert und mit Parafilm luftdicht verschlossen. *C. rolfii* (Cr2) wurde gleichzeitig in anderen Kolben inokuliert und mit den *Trichoderma* - Kulturen verbunden. Zwischen den beiden miteinander verbundenen Kulturen bestand kein direkter Kontakt, aber durch den Kolben strömen von *Trichoderma* ausgeschiedene gasförmige Substanzen zum Pathogen. Eine mögliche Wirkung solcher diffusibler Stoffwechselprodukte von *Trichoderma* auf das Wachstum von *C. rolfii* wurde im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ermittelt (Tab. 16).

**Tab. 16:** Wirkung volatiler Hemmstoffe von *Trichoderma* spp. auf das Wachstum von *C. rolfii* 0 und 10 Tage nach der Inokulation von *Trichoderma* auf PDYA-Medium. (Auswertung 5 Tage nach der Inokulation von *C. rolfii*).

<i>Trichoderma</i> spp.	Erreger	Wachstum des Erregers Kontrolle (%)	Wachstumshemmung des Erregers (%)
T-126	Cr2	100	41,4 (*) 11,5 (+)
T-040	Cr2	100	28,0 (*) 8,34 (+)
T-226	Cr2	100	70,7 (*) 42,0 (+)
T-190	Cr2	100	34,4 (*) 16,6 (+)
T-192	Cr2	100	66,7 (*) 34,5 (+)
T-12j	Cr2	100	28,0 (*) 10,0 (+)
T-047	Cr2	100	68,9 (*) 28,8 (+)

(\*) *Trichoderma* spp. und *C. rolfii* wurden am gleichen Tag inokuliert

(+) *Trichoderma* spp. wurde 10 Tage vorinokuliert

(T-126) *T. harzianum*

(T-190) *T. viride*

(T-040) *T. harzianum*

(T-192) *T. viride*

(T-226) *T. viride*

(T-047) *T. hamatum*

(T-12j) *Trichoderma* spp.

Normalerweise wachsen *Trichoderma* spp. sehr schnell. Dabei werden viele Produkte, wie z.B. Toxine und Enzyme, ausgeschieden. Die Produktion solcher Substanzen in kurzer Zeit und in bestimmten Mengen ist keine Regel für alle *Trichoderma*-Stämme. So verursachten T-226 und T-047 jeweils eine Wachstumshemmung von Cr2 von 70,7 % und 68,9 %. Vermutlich sind diese und andere Antagonisten in der Lage, solche Stoffwechselprodukte schnell zu produzieren, um das Wachstum anderer Pilze zu unterdrücken. Bei den übrigen *Trichoderma*-Stämmen (T-126, T-040, T-226, T-190, T-192, T-12j und T-047) betrug die Wirkung gegen Cr2 im gleichen Zeitraum nur 28 und 41,1%.

Solange eine ausreichende Menge oder bestimmte Stoffe noch nicht gebildet sind, kann sich der Pathogen weiter entwickeln, sein Wachstum wird nur leicht verzögert. Haben *Trichoderma* spp. aber die Substanzen nach einer bestimmten Zeit in ausreichenden Mengen produziert, wird das Wachstum des Erregers nachhaltig gehemmt. Beim Antagonismusprozeß von *Trichoderma* spp. werden diese Substanzen ausgeschieden, noch bevor *Trichoderma* den Pathogen parasitieren kann. Es wurde beobachtet, daß die Antagonisten T-126, T-040, T-226, T-190, T-192, T-12j und T-047 für die Ausscheidung einer ausreichenden Menge der volatilen Stoffe 2 bis 3 Tage benötigen. Im Antagonismustest in Dualkulturen haben diese Stämme die gleiche Zeit benötigt, um die Kolonie des Pathogens zu besiedeln. Dies legt die Vermutung nahe, daß *Trichoderma* spp. diese Substanzen unbedingt benötigen, um den Pilz parasitieren zu können. Ob diese Substanzen zusammen mit Enzymen bei der Parasitierung beteiligt sind, ist jedoch noch unklar. Tab 16. zeigt unter (+) die Ergebnisse der Wachstumshemmung von Cr2 durch *Trichoderma* spp. 15 Tagen nach der Vorinokulation. Alle untersuchten *Trichoderma*-Stämme zeigten eine erhebliche Verringerung in ihrem Wirkungsgrad gegen Cr2. Damit wurde gezeigt, daß die Produktion von volatilen Stoffwechselprodukten durch *Trichoderma* spp. abhängig ist vom Nährstoffangebot. Je älter die Kulturen von *Trichoderma* sind, desto geringer ist die Menge von Gasen, die der Pilz produziert. Als Folge davon kann *Trichoderma* spp. nur für bestimmte Zeit die Entwicklung des Pathogens verzögern. Bei der Produktion von Stoffwechselprodukten und für die Ausprägung des Antagonismus von *Trichoderma* spielt das Nahrungsangebot eine große Rolle.

Tab. 17 zeigt weitere Ergebnisse der Wirkung von volatilen Gasen von vorinokulierten *Trichoderma*-Stämmen. Die *Trichoderma*-Stämme wurden auf PDYA-Nährmedien im Kolben sieben Tage lang vorinokuliert und mit Parafilm luftdicht verschlossen. Eine erhebliche Wirkung solcher diffusiblen Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Pathogene im Vergleich mit der Kontrolle wurde beobachtet.



**Tab. 17:** Wirkung volatiler Hemmstoffe von 7 und 22 Tage alten *Trichoderma*-Kulturen auf das Wachstum wichtiger phytopathogener Pilze auf PDYA. (Erste Auswertung fünf Tage nach Inokulation der Erreger).

<i>Trichoderma</i> spp.	Erreger	Wachstum des Erregers Kontrolle (%)	Wachstumshemmung des Erregers (%)
7 Tage Inokulationszeit von <i>Trichoderma</i> spp.		12 Tage Inokulationszeit der Erreger	
T-093	RS <sub>193</sub>	100	76,2
T-093	Fc <sub>207</sub>	100	90,5
T-165	Fox <sub>207</sub>	100	88,1
T-391	Pd <sub>330</sub>	100	70,2
T-257	Pd <sub>330</sub>	100	0
22 Tage Inkubationszeit von <i>Trichoderma</i> spp.		15 Tage Inkubationszeit der Erreger	
T-093	RS <sub>193</sub>	100	54,8
T-093	Fc <sub>207</sub>	100	52,4
T-165	Fox <sub>207</sub>	100	50
T-391	Pd <sub>330</sub>	100	58,3

(T-093) *Trichoderma hamatum* Bon.

(T-165) *Trichoderma koningii* Oud.

(T-391) *Trichoderma harzianum* Rifai.

(T-257) *Trichoderma harzianum* Rifai.

(RS<sub>193</sub>) *Rhizoctonia solani* Kühn.

(Fc<sub>207</sub>) *Fusarium culmorum*

(Fox<sub>207</sub>) *Fusarium oxysporum* (Schlecht).

(Pd<sub>330</sub>) *Pythium debaryanum* Drechsler.

Bei der Suche und Selektion wirksamer *Trichoderma*-Stämme wurden weitere Laborversuche hinsichtlich der Bildung flüchtiger Stoffe gegen bodenbürtige Pilze durchgeführt. Der Wirkungsgrad gegen wichtige Krankheitserreger war bei sieben Tage vorinokulierten *Trichoderma*-Kulturen sehr hoch (Tab. 17). T-257 zeigt keine Wirkung gegen *Pythium debaryanum*. Bei einer Vorinokulation der *Trichoderma* spp. von 22 statt 7 Tagen war aber eine deutliche Hemmung von 58,3% vorhanden. Dies unterstreicht die Bedeutung des Zeitfaktors für die Bildung volatiler Hemmstoffe.



### Wachstumshemmung von *Trichoderma* spp. in Agarschalen

Die Wirkung volatiler Hemmstoffe von T-190 und T-040 in Abhängigkeit vom Nährmedium und der Inokulationszeit wurde mit Cr2 in Dualkulturen getestet. Als Medium für Cr2 wurde MPA ausgewählt. Die mit den Pilzen inokulierten Petrischalen wurden mit sterilem Filterpapier getrennt und mit Parafilm verschlossen. Das Filterpapier wurde verwendet, um eine mögliche Übertragung von Pilzmaterial zwischen *Trichoderma* und Cr2 zu vermeiden. Von *Trichoderma* ausgeschiedene Stoffe konnten jedoch durch das Papier dringen. Es zeigte sich, daß die diffusiblen Substanzen von *T. viride* eine unterschiedliche Wirkung gegen Cr2 haben (Tab. 18, Tab 19).

**Tab. 18:** Wirkung volatiler Hemmstoffe von *Trichoderma viride* (T-190) auf verschiedenen Nährmedien und bei verschiedenen Vorinkubationszeiten auf *C. rolfii* (Cr2) in %

Nährmedien von <i>Trichoderma</i> spp.	Nährmedien von <i>C. rolfsii</i>	Wachstum von <i>C. rolfsii</i> Kontrolle (%)	Wachstumshemmung von <i>C. rolfsii</i> (%)
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 3 Tage			
T190 - PDA	MPA - Cr2	100	67,8
T190 - HDA			58,3
T190 - HGHA			66,8
T190 - PDYA			100,0
T190 - MPA			30,9
T190 - V8			44,1
T190 - GHA			32,7
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 4 Tage			
T190 - PDA	MPA - Cr2	100	73,8
T190 - HDA			72,7
T190 - HGHA			83,3
T190 - PDYA			79,7
T190 - MPA			70,2
T190 - V8			59,5
T190 - GHA			70,2
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 5 Tage			
T190 - PDA	MPA - Cr2	100	63,1
T190 - HDA			100,0
T190 - HGHA			70,2
T190 - PDYA			52,3
T190 - MPA			82,1
T190 - V8			46,4
T190 - GHA			58,3
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 6 Tage			
T190 - PDA	MPA - Cr2	100	54,7
T190 - HDA			64,2
T190 - HGHA			61,9
T190 - PDYA			16,6
T190 - MPA			100,0
T190 - V8			28,5
T190 - GHA			57,1
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 12 Tage			
T190 - PDA	MPA - Cr2	100	9,6
T190 - HDA			7,2
T190 - HGHA			8,3
T190 - PDYA			16,6
T190 - MPA			7,1
T190 - V8			11,9
T190 - GHA			13,0

**Berechnung der Wachstumshemmung in %**

**Tab. 19:** Wirkung volatiler Hemmstoffe von *Trichoderma harzianum* (T-040) auf verschiedenen Nährmedien und bei verschiedenen Vorinkubationszeiten auf *C. rolfii* (Cr<sub>2</sub>) in %

Nährmedien von <i>Trichoderma</i> spp.	Nährmedien von <i>C. rolfsii</i>	Wachstum von <i>C. rolfsii</i> Kontrolle (%)	Wachstumshemmung von <i>C. rolfsii</i> (%)
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 3 Tage			
T040 - PDA	MPA - Cr2	100	100,0
T040 - HDA			16,6
T040 - HGHA			100
T040 - PDYA			100
T040 - MPA			50,0
T040 - V8			78,7
T040 - GHA			100,0
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 4 Tage			
T040 - PDA	MPA - Cr2	100	78,5
T040 - HDA			65,2
T040 - HGHA			85,7
T040 - PDYA			79,7
T040 - MPA			47,6
T040 - V8			61,9
T040 - GHA			100,0
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 5 Tage			
T040 - PDA	MPA - Cr2	100	71,4
T040 - HDA			75,0
T040 - HGHA			78,5
T040 - PDYA			59,5
T040 - MPA			64,3
T040 - V8			46,7
T040 - GHA			58,3
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 6 Tage			
T040 - PDA	MPA - Cr2	100	63,1
T040 - HDA			100,0
T040 - HGHA			70,2
T040 - PDYA			61,6
T040 - MPA			100,0
T040 - V8			35,7
T040 - GHA			57,1
Vorinkubationszeit von <i>Trichoderma</i> : 12 Tage			
T040 - PDA	MPA - Cr2	100	7,1
T040 - HDA			44,0
T040 - HGHA			16,6
T040 - PDYA			23,8
T040 - MPA			15,2
T040 - V8			13,1
T040 - GHA			15,8

**Berechnung der Wachstumshemmung in %**

Die Wachstumshemmung von *C. rolfii* (Cr<sub>2</sub>) ist stärker ausgeprägt bei T-040 als bei T-190, erreicht aber bei beiden Stämmen eine hohe Wirkung bei einer Vorinkubationszeit von 3 bis 6 Tagen. Zusammen mit dem Nährmedium spielt die Inkubationszeit bei der Ausscheidung wirksamer volatiler Substanzen eine besondere Rolle (Tab. 18, Tab. 19). Die Wirkung der ausgeschiedenen Stoffen nimmt in ihrer Aktivität nach 12 Tagen Inkubation von *Trichoderma* spp. deutlich ab. Auch beim Antagonismustest in Dualkulturen zeigen *Trichoderma* spp. eine höhere Aggressivität gegenüber dem Pathogen drei und vier Tage nach der Inokulation.

### 3.4.4 Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen Sklerotien von *C. rolfii*

Die Fähigkeit einiger *Trichoderma*-Stämme, Sklerotien von *C. rolfii* (Cr2) zu besiedeln und abzubauen, wurde im Labor nach KÖHL & SCHLÖSSER (1989) bestimmt. Von den auf MPA-Medium gebildeten Sklerotien wurden je 20 Sklerotien auf Agarkulturen (MPA) der verschiedenen *Trichoderma* spp. gelegt und durch Schütteln gleichmäßig mit Konidien „gepudert“. Nach 24 Stunden wurden die Sklerotien auf sterile Schalen mit feuchtem Filterpapier überführt und für zwei Wochen bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit zeigten 61,5% der geprüften *Trichoderma*-Stämme eine Fähigkeit von 100%, die Sklerotien zu besiedeln. Im Gegensatz dazu waren 15,3% der *Trichoderma* spp. nicht fähig, die Sklerotien zu überwachsen, drei Stämme der *Trichoderma* spp. waren in der Lage, zwischen 75 % und 100 % der Sklerotien abzubauen oder zu mazerieren. Es gelang vier *Trichoderma*-Stämmen, bis zu 50% der Sklerotien abzubauen. Insgesamt vermochten zehn der dreizehn Stämme, die Sklerotien stark zu besiedeln. Die abgebauten Sklerotien waren nicht mehr lebensfähig. Die nicht abgebauten Sklerotien wurden daraufhin geprüft, ob sie noch lebensfähig waren. Insgesamt wurden 156 Sklerotien der gesamten Versuche gesammelt, von denen 41% auf dem Selektivmedium mit Benomyl keine Keimung zeigten und 59% auswuchsen. Abgebaute und nicht gekeimte Sklerotien erreichten 64,6% gegenüber 35,4% keimfähiger Sklerotien (Tab. 20).

**Tab. 20: Besiedlung und Abbau der Sklerotien von *Corticium rolfii* durch *Trichoderma*-Stämme (jeweils 20 Sklerotien pro Variante)**

<i>Trichoderma</i>	Besiedelte Sklerotien (%)		Stärke der Besiedlung			Abgetötete Sklerotien (%)	
	ja	nein	keine	schwach	stark	ja	nein
T-12j - 20xCr2	100	0			+	75	25
T-126 - 20xCr2	0	100	+			0	100
T-190 - 20xCr2	58	42			+	55	45
T-040 - 20xCr2	76	24			+	40	60
T-226 - 20xCr2	100	0			+	80	20
T-250 - 20xCr2	0	100	+			0	100
T-115 - 20xCr2	100	0		+		0	100
T-029 - 20xCr2	100	0			+	65	35
T-192 - 20xCr2	100	0			+	35	75
T-134 - 20xCr2	100	0			+	75	25
T-391 - 20xCr2	100	0			+	15	85
T-218 - 20xCr2	22	78			+	60	40
T-047 - 20xCr2	100	0			+	45	55

**T-12j** *Trichoderma* spp.  
**T-126** *T. harzianum*  
**T-190** *T. viride*  
**T-040** *T. harzianum*  
**T-226** *T. viride*  
**T-250** *T. harzianum*  
**T-115** *T. viride*

**T-029** *T. koningii*  
**T-192** *T. viride*  
**T-134** *T. hamatum*  
**T-391** *T. harzianum*  
**T-218** *T. viride*  
**T-047** *T. hamatum*

Gekochte Hirsesamen, die bei verschiedenen Versuchen sowohl im Labor als auch im Gewächshaus als Inokulumträger von *C. rolfii* dienten, wurden auf ihre Empfindlichkeit gegen *Trichoderma*-Stämme getestet. Nach sieben Tagen Inkubationszeit bei Raumtemperatur besiedelten alle *Trichoderma*-Stämme die Träger von *C. rolfii* und bildeten Myzel. Eine 100%ige Mazeration der Träger erreichten die meisten Stämme. Der Stamm T-115 wies 65 % abgebaute Träger und 35 % keimfähige Träger auf, T-391 mazerierte 80 % der Träger und 20 % blieben keimfähig. Bei 92,4 % aller Stämme lag generell ein intensives Myzelwachstum vor, und sie waren in der Lage, die Träger (HCr2) sehr stark zu besiedeln (Tab. 21).

**Tab. 21: Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen Hirse - Inokulumträger von *C. rolfii* (HCr2) (jeweils 20 Körner pro Variante)**

<i>Trichoderma</i>	Besiedelte Körner (%)		Stärke der Besiedlung			Abgetötete Körner (%)	
	ja	nein	keine	schwach	stark	ja	nein
T-12j – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-126 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-190 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-040 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-226 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-250 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-115 – 20xHCr2	100	0		+		65	35
T-029 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-192 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-134 – 20xHCr2	100	0			+	100	0
T-391 – 20xHCr2	100	0			+	80	20
T-218 – 20xHxCr2	100	0			+	100	0
T-047 – 20xHCr2	100	0			+	100	0

**T-12j** *Trichoderma* spp.

**T-126** *T. harzianum*

**T-190** *T. viride*

**T-040** *T. harzianum*

**T-226** *T. viride*

**T-250** *T. harzianum*

**T-115** *T. viride*

**T-029** *T. koningii*

**T-192** *T. viride*

**T-134** *T. hamatum*

**T-391** *T. harzianum*

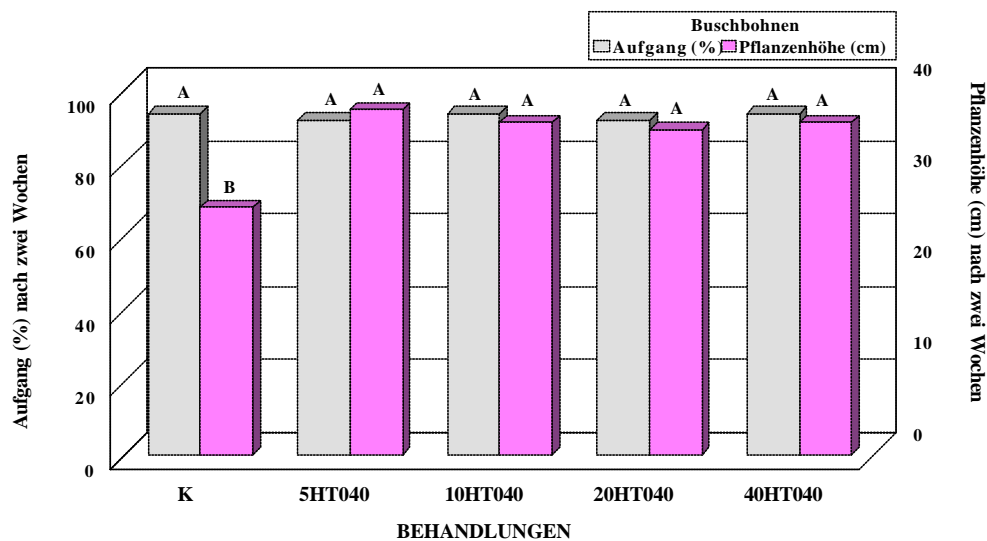
**T-218** *T. viride*

**T-047** *T. hamatum*

### 3.5 Gewächshausversuche

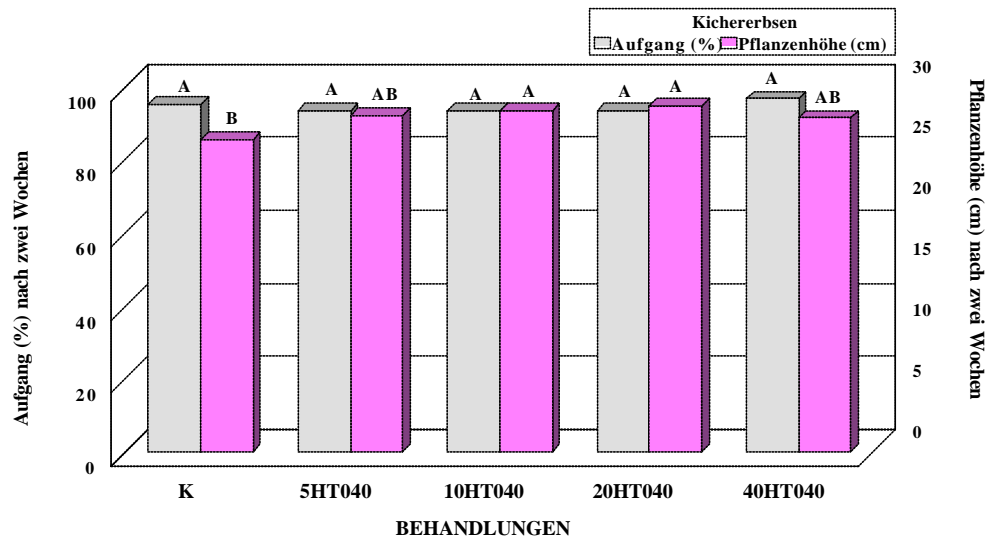
#### 3.5.1 Wirkung der Inokulummenge von *T. harzianum* (HT-040) auf Buschbohnen- und Kichererbsen

Im folgenden Versuch wurden gekochte Hirsekörner als Inokulumträger von *Trichoderma* spp. verwendet. Nach dreiwöchiger Inkubation der Hirsekörner wurden 5, 10, 20 und 30 Körner im Boden mit den Bohnen- und Kichererbsensamen neben den Samen ausgebracht und ihre Wirkung auf Keimfähigkeit und Pflanzenlänge ermittelt (Abb. 16a; 16b).



**Abb. 16a:** Wirkung der Inokulummenge von *Trichoderma* (T-040) auf Aufgang und Pflanzenhöhe bei Buschbohnen, 2 Wochen nach Aussaat.  
**Inokulumträger:** Hirsekörner.  
 Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

Die Keimfähigkeit von Bohnen und Kichererbsen zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 16a, Abb. 16b). In beiden Fällen ist ein etwas höherer Auflauf zu beobachten. Die Auswertung der Pflanzenlänge der Bohnen dagegen ergab bei den mit *Trichoderma* behandelten Samen eine höhere Signifikanz gegenüber der Kontrolle. Durchschnittlich erreichten die behandelten Pflanzen eine Länge von 36 cm gegenüber 27 cm bei der Kontrolle. Gleichzeitig wurde auch die Pflanzenentwicklung gefördert. Bei Kichererbsen wurde ebenfalls die Pflanzenlänge signifikant gefördert. Eine phytotoxische oder negative Wirkung der *Trichoderma* spp. wurde nicht beobachtet.



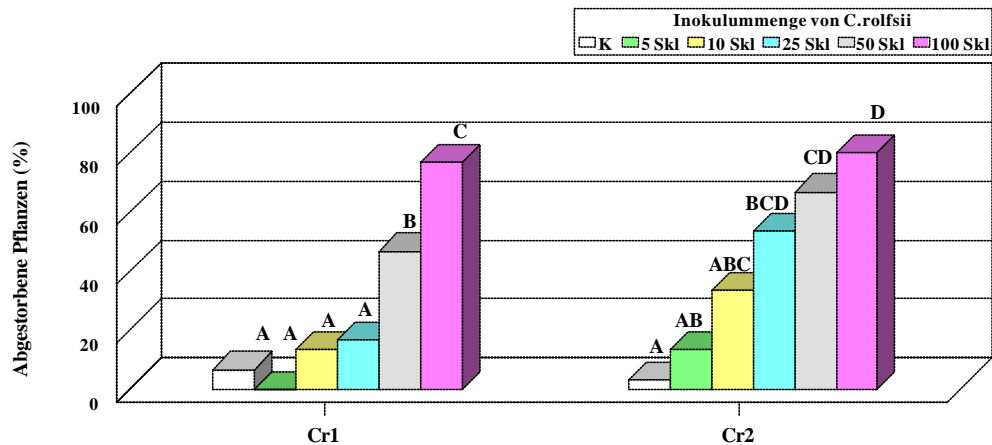
**Abb. 16b:** Wirkung der Inokulummenge von *Trichoderma* (T-040) auf Aufgang und Pflanzenhöhe bei Kichererbsen, 2 Wochen nach Aussaat.  
 Inokulumträger: Hirsekörner.  
 Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

### 3.5.2 Pathogenitätstest von *C. rolfsii*

Zwei Stämme von *C. rolfsii* (Cr1 und Cr2) wurden zur Inokulation von Pflanzen benutzt und die Aggressivität von Sklerotien untersucht. Im Labor wurden die Pilze Cr1 und Cr2 auf verschiedenen Nährmedien gewonnen. Die dabei erzeugten Sklerotien wurden geerntet und zur Inokulation von Pflanzen verwendet. Um zu überprüfen, ob diese Stämme aggressiv und in der Lage sind, wichtige Kulturpflanzen zu befallen, wurden verschiedene Pflanzen als Wirte benutzt und mit dem Pathogen inokuliert.

#### Sklerotien

Bei den im Gewächshaus durchgeführten Versuchen wurden Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) für die Inokulation des Pilzes verwendet. Mengen von 5, 10, 25, 50 und 100 Sklerotien von 0,5 bis 3 mm Durchmesser wurden zu den Samen gegeben und leicht mit Erde bedeckt. Die durchschnittliche Temperatur betrug 25 °C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 70 %.

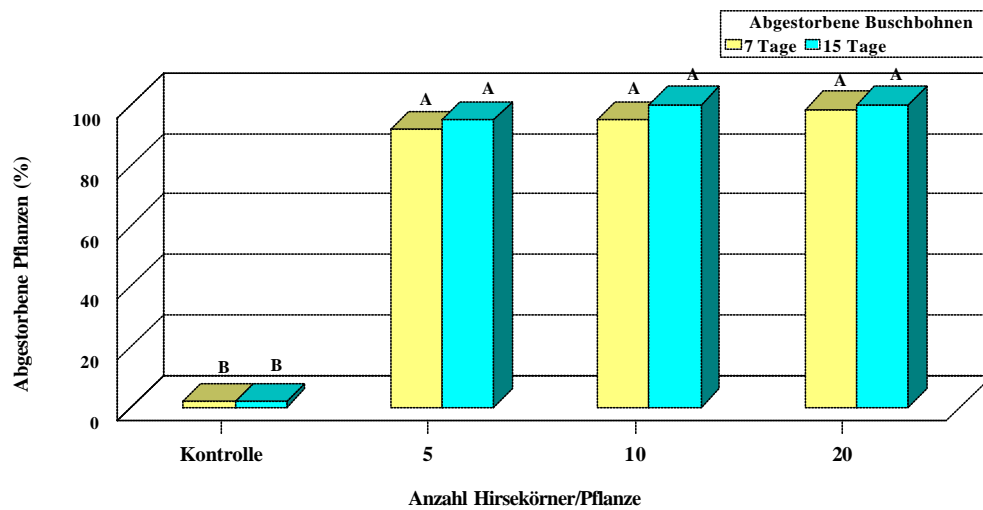


**Abb. 17:** Prozentsatz abgestorbener Buschbohnen nach Inokulation mit Sklerotien von *C. rolfii* (Cr1, Cr2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, in Abhängigkeit von der Anzahl der Sklerotien, 2 Wochen nach Aussaat.  
**Pflanzensubstrat:** Kompost LD-80.  
 Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

Die Bohnen wurden mit unterschiedlicher Befallstärke angegriffen, bei *C. rolfii* (Cr2) war die Anzahl der abgestorbenen Pflanzen nach zwei Wochen sehr hoch. Die Mortalität der Pflanzen steht in Zusammenhang mit der verwendeten Inokulummenge sowohl von *C. rolfii* (Cr1) als auch von (Cr2). Bei Cr1 hat die Inokulummenge von 5 bis 25 Sklerotien im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede gezeigt. In diesem Bereich erreichte die Mortalität der Pflanzen 17% gegenüber 53% bei Cr2. Der Prozentsatz der abgestorbenen Pflanzen mit 50 Sklerotien lag bei 47% für Cr1 und 67% für Cr2. Die Verwendung von 100 Sklerotien hat bei beiden Isolaten eine sehr große Anzahl abgestorbener Pflanzen verursacht. In beiden Fällen wurden die Pflanzen vor und nach dem Aufgang durch den Pilz befallen.

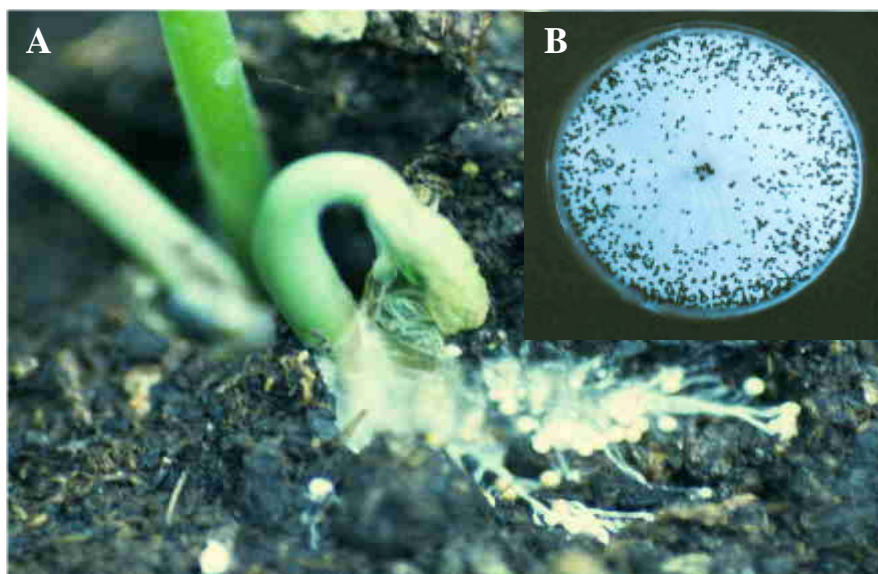
## Hirsekörner

Das Isolat Cr2 wurde wegen seiner gezeigten Virulenz für alle weiteren im Labor und im Gewächshaus durchgeführten Untersuchungen ausgewählt. Gekochte Hirsesamen wurden als Inokulumträger des Pathogens verwendet. Buschbohnen (Abb. 18), Kichererbsen (Abb. 20) und Linsen (Abb. 21) wurden als Wirtspflanzen des Pilzes verwendet. Die Samen wurden mit Inokulummengen von 5, 10 und 20 Hirsekörnern (Cr2) inokuliert.



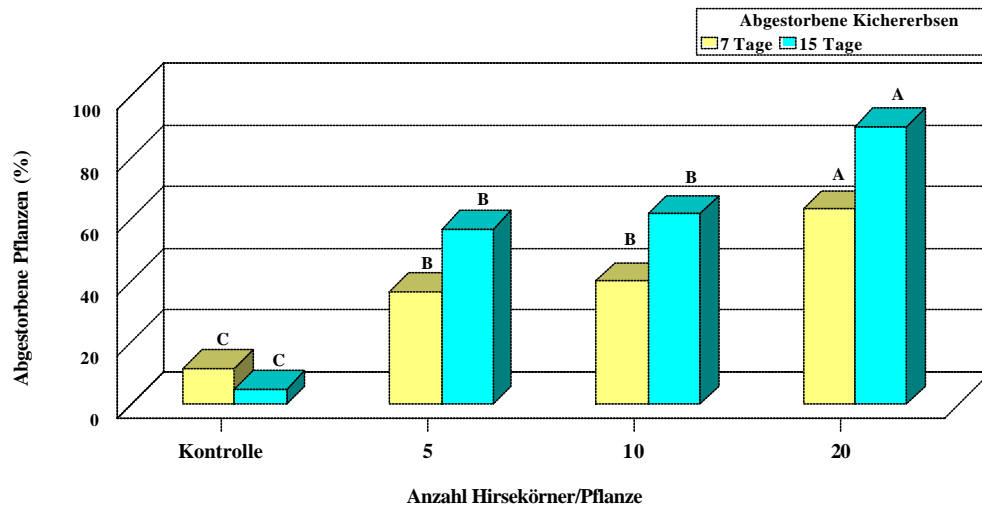
**Abb. 18:** Prozentsatz abgestorbener Buschbohnen nach Inokulation mit *C. rolfii* (Cr<sub>2</sub>) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

Bei diesem Versuch war Cr<sub>2</sub> in der Lage, die Pflanzen zu befallen und in allen Behandlungen einen hohen Prozentsatz an Mortalität zu verursachen. Nach sieben Tagen wurden bereits die Keimlinge befallen und schnell bildete *C. rolfii* auf dem Boden ein weißes Myzel und eine große Anzahl von Sklerotien (Abb. 19). Die Verwendung von Hirsekörnern als Inokulumträger des Erregers war also eine geeignete Methode zur Induktion der Krankheit. Eine Inokulummenge von 5 bewachsenen Hirsekörnern war ausreichend, um in kurzer Zeit eine nahezu 100%ige Mortalität der Bohnenpflanzen zu erreichen.



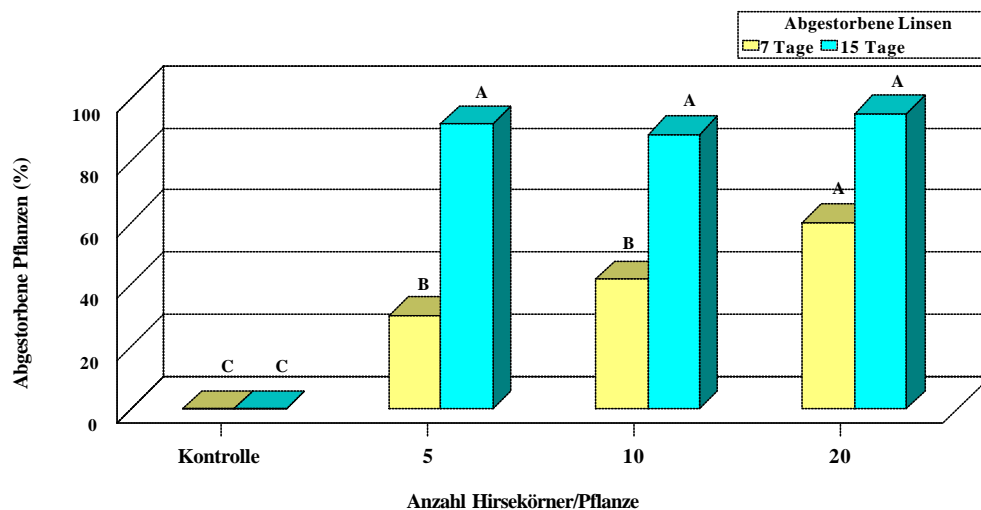
**Abb. 19** (A): Befallene Hypokotilen von Bohnen *P. vulgaris* L. durch *C. rolfii*. Auf der Bodenoberfläche bildet der Pilz ein weißes Myzel und runde Sklerotien. (B): Wachstum und Bildung von Sklerotien von *C. rolfii* (Cr<sub>2</sub>) auf PDA.





**Abb. 20:** Prozentsatz abgestorbener Kichererbsen nach Inokulation mit *C. rolfii* (Cr2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.  
 Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.  
 Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

Sieben Tage nach der Inokulation von Kichererbsen mit Cr2 zeigen diese in den Behandlungen Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle. Mengen von 20 Hirsekörnern verursachten mehr als 60 % Mortalität bei den Pflanzen. Nach 15 Tagen war in allen Behandlungen über 50 % Mortalität erreicht. Die mit 20 Cr2 behandelten Pflanzen zeigten über 90% abgestorbene Pflanzen.

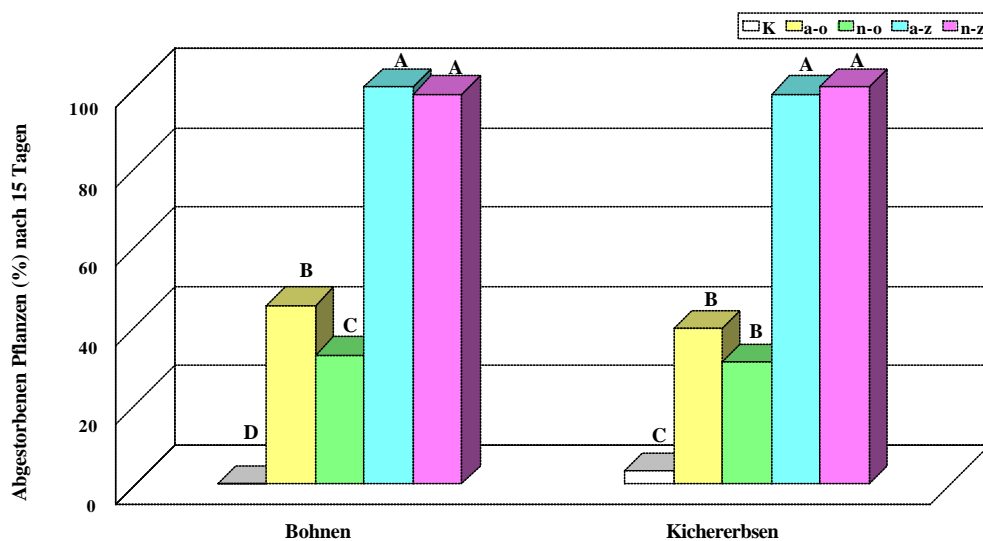


**Abb. 21:** Prozentsatz abgestorbener Linsen nach Inokulation mit *C. rolfii* (HCr2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.  
 Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.  
 Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

Wie bei den Versuchen mit Kichererbsen und Buschbohnen zeigten sich auch die Linsenpflanzen sehr anfällig gegen *C. rolf sii*. Eine erhebliche Anzahl von Pflanzen wurden schon nach sieben Tagen befallen, nach fünfzehn Tagen war in allen Varianten über 90 % Mortalität vorhanden.

### Wirkung von Inokulationsmethoden und dem Alter des Inokulums von *C. rolf sii*

In weiteren Topfversuchen wurde das Inokulum von *C. rolf sii* in Mengen von 10 Hirsekörnern verschiedenen Alters und unter Verwendung verschiedener Inokulationsmethoden auf seine Fähigkeit, Buschbohnen und Kichererbsen zu befallen, getestet. Frisches und sechs Monate altes Inokulum wurden entweder zu den Samen gegeben oder auf der Bodenoberfläche verteilt. Es zeigte sich, daß bei Inokulation der Pflanzen das alte Inokulum wirksamer ist als das frische Inokulum (Abb. 22). Bei Buschbohnen war die Wirkung von altem und frischem Inokulum nach Applikation auf der Bodenoberfläche signifikant verschieden. Hier erreichte das alte Inokulum eine Wirksamkeit von 45 % gegenüber 32 % bei neuem Inokulum. Bei Kichererbsen erreichte das ältere Inokulum eine Wirksamkeit von 39 % gegenüber 30 % und hatte somit keinen signifikanten Unterschied. Wurden das alte und das neue Inokulum zu den Samen gegeben, verursachten beide Inokuli eine Mortalität von 98 % bis 100 % sowohl bei Bohnen als auch bei Kichererbsen. Diese Art der Applikation war also deutlich effektiver.



**Abb. 22:** Prozentsatz abgestorbener Buschbohnen und Kichererbsen nach Inokulation mit 10 Hirsekörnern (Cr2) in Abhängigkeit vom Alter des Inokulums und vom Inokulationsort im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

(a-o) altes Inokulum–oberflächlich verteilt; (a-z) altes Inokulum–zusammen mit den Samen;

(n-o) neues Inokulum–oberflächlich verteilt; (n-z) neues Inokulum–zusammen mit den Samen. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

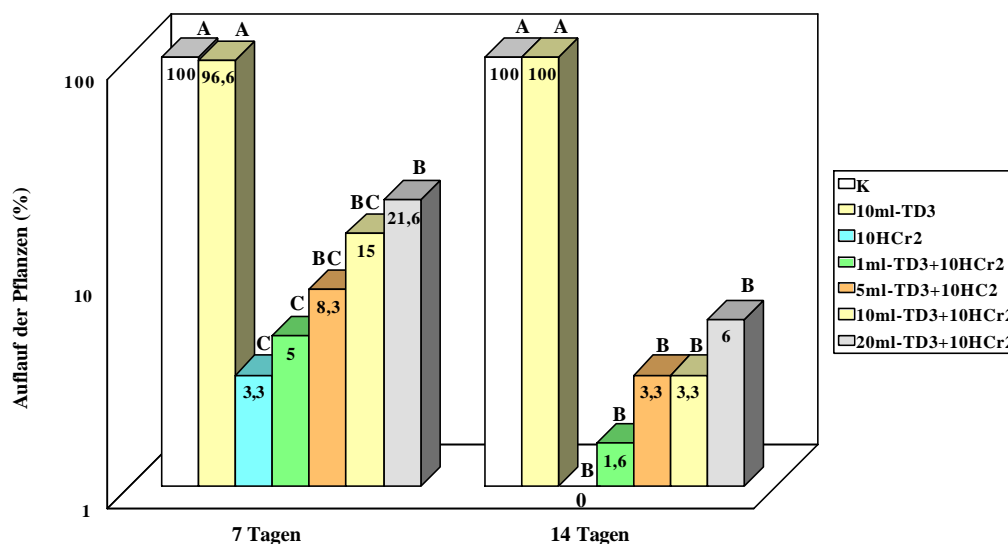
Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

### 3.5.3 Anwendungsverfahren von *Trichoderma* spp.

Die Nutzung von *Trichoderma* spp. bietet die Möglichkeit einer biologischen Bekämpfung bodenbürtiger Erreger. In dieser Untersuchung wurden unter Gewächshausbedingungen verschiedene Anwendungsverfahren von *Trichoderma* bei Buschbohnen gegen *C. rolf sii* untersucht.

#### Bodenbehandlung mit Konidiensuspensionen von *T. harzianum* (T-040)

Gewonnene Konidiensuspensionen aus PDA-Medium wurden auf  $2 \times 10^7$  Konidien/ml Wasser eingestellt (TD3) und gegen 10 von *C. rolf sii* bewachsene Hiersekörner mit Buschbohnen getestet. Die Suspensionen wurden in Mengen von 1, 5, 10 und 20 ml je Topf auf die Samen appliziert. Als eine andere Variante wurden 10 ml der Konidiensuspension TD3 allein aufgewandt.



**Abb. 23:** Wirkung eines PDA-Inokulums von *T. harzianum* (T-040) in Abhängigkeit von der Inokulummenge bei Buschbohnen nach Inokulation mit *C. rolf sii* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Inokulumkonzentration: (TD3 =  $2 \times 10^7$  Konidien/ml Wasser).

Der Maßstab des Aufgangs der Pflanzen ist logarithmisch dargestellt.

Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

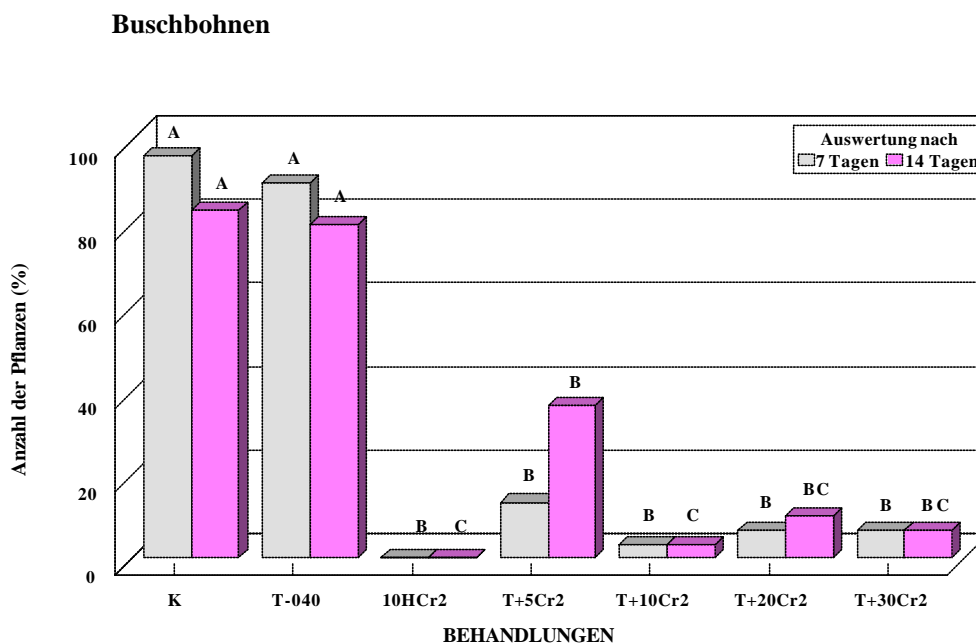
Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

Nach 7 Tagen erreichte der Auflauf der Pflanzen durch die Applikation von 20 ml *Trichoderma* – Suspension 21%, die mit dem Pathogen inokuliert wurden. Er unterscheidet sich statistisch signifikant von den anderen Behandlungen, bei denen *Trichoderma* und *C. rolf sii* inokuliert wurden. Die Zahl der aufgegangenen Pflanzen, bei denen *Trichoderma harzianum* (T-040) in Mengen von 1, 5 und 10 ml Suspension im Boden gegen Cr2 aufgewendet wurde, war sehr niedrig. Eine Keimfähigkeit von 96,6% der Pflanzen wurde in den Versuchen, in denen allein 10 ml *Trichoderma*-Suspension (TD3) verwendet wurden, erreicht, 100% bei der unbehandelten Kontrolle. Die Wirkung von *Trichoderma* gegen den Erreger verringerte sich deutlich nach 14 Tagen (Abb. 23). Grund dafür ist wahrscheinlich, daß

*Trichoderma* sich den neuen Bedingungen nicht schnell genug anpaßt, als Folge ihre Populationen erheblich abnehmen und der Pilz nicht mehr in der Lage ist, das Wachstum des Pathogens zu unterdrücken. Auch das Nahrungsangebot während des Wachstum des Pilzes könnte eine wichtige Rolle spielen.

### Samenbehandlung mit Konidiensuspensionen von *T. harzianum* (T-040)

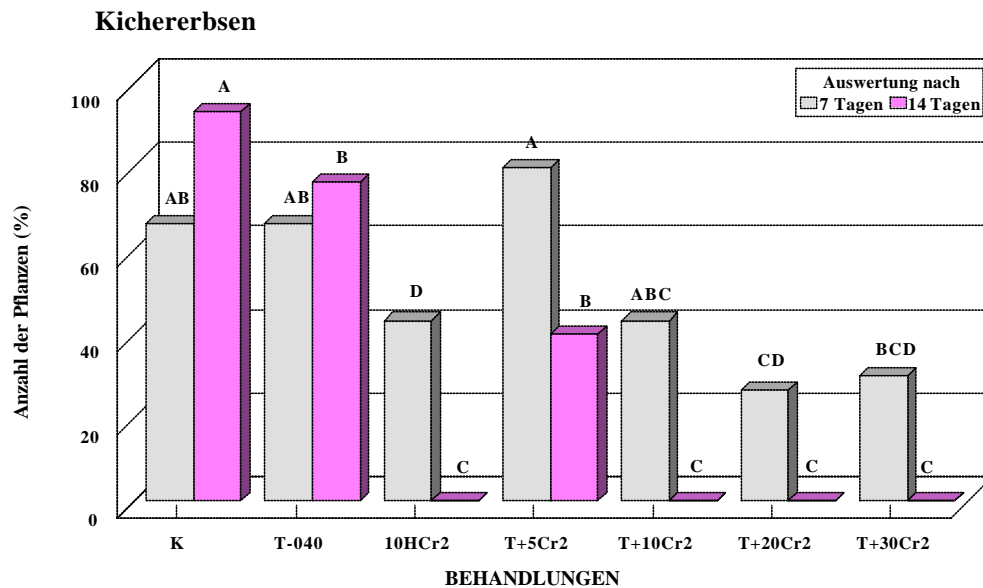
In diesen Experimenten wurden Konidiensuspensionen von *Trichoderma* (T-040)  $5 \times 10^6$  Konidien/ml (TD2) verwendet. Die Samen von Buschbohnen (Abb. 24a) und Kichererbsen (Abb. 24b) wurden mit der Formulierung von *Trichoderma* 9 Stunden eingequollen und mit 5, 10, 20 oder 30 Hirsekörnern als Inokulum des Pathogens untersucht. Für die Inokulumproduktion von *Trichoderma* wurde Hirsesamen als Nahrungsquelle verwendet.



**Abb. 24a:** Wirkung der Konidiensuspension von T040 auf den Aufgang von Buschbohnen nach 9 Stunden Einquellzeit in Abhängigkeit von der Inokulumkonzentration von *C. rolfii* (Cr2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dosis von *Trichoderma* (TD2) =  $5 \times 10^6$  Konidien/ml. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

Die Wirksamkeit von *Trichoderma* spp. wies nach 7 Tagen keine Signifikanz zwischen den einzelnen Behandlungen auf, bei denen *C. rolfii* inokuliert wurde. Bei der Behandlung TD2+5Cr<sub>2</sub> erreichte *Trichoderma* eine Wirkung von 36 %, bei den übrigen Behandlungen hatten die Pflanzen einen maximalen Aufgang von 10 %. Wie an den hier gezeigten Ergebnissen zu sehen ist, ist die Wirkung von *Trichoderma* spp. abhängig von der Inokulumkonzentration des Pathogens, der im Boden vorkommt, und von der Inokulumkonzentration der jeweiligen verwendeten *Trichoderma*. Bei der Samenbeizung spielt die Einquellzeit eine wichtige Rolle. Einerseits beeinflußt die Konidiensuspension die Keimfähigkeit der Buschbohnen nach 9 Stunden Einquellzeit, andererseits verhindert die Flüssigkeit, daß die Biomasse von *Trichoderma* in den Samen haften bleiben kann, wie dies z. B. bei der Verwendung von Alginat als Haftmittel geschieht.



**Abb. 24b:** Wirkung der Konidiensuspension von T040 auf den Aufgang von Kichererbsen nach 9 Stunden Einquellzeit in Abhängigkeit von der Inokulumkonzentration von *C. rolfii* (Cr2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dosis von *Trichoderma* (TD2) =  $5 \times 10^6$  Konidien/ml. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

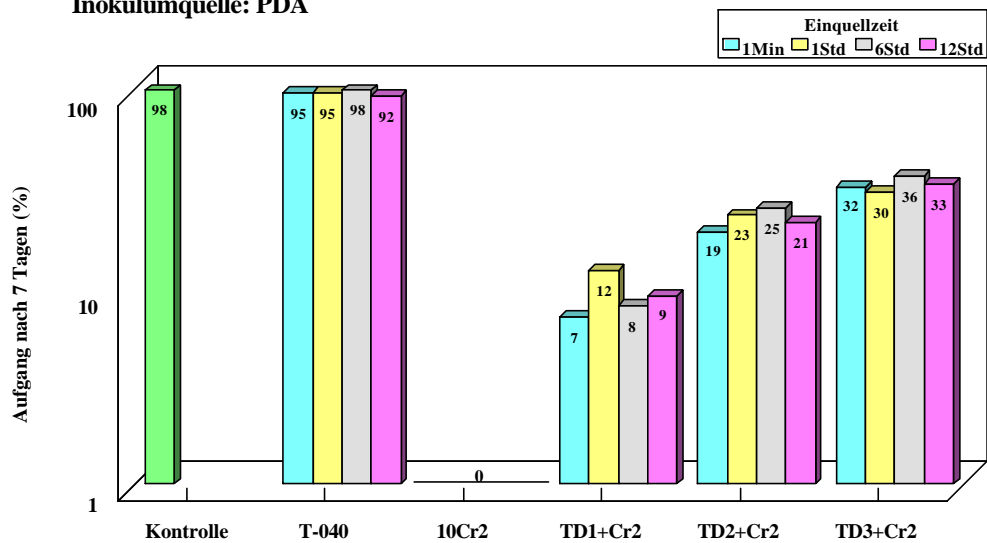
Die Einquellzeit der Samen (9 Stunden) in Konidiensuspensionen von *T. harzianum*, das auch bei Bohnen eingesetzt wurde, beeinflusste auch den Aufgang der Kichererbsen. Bei Kichererbsen betrug die Aufgangsrate der Keimlinge nach sieben Tagen 80%, damit gab es keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Nach 14 Tagen verringerte sich die Wirksamkeit von *Trichoderma* um 40% und die Zahl der abgestorbenen Pflanzen erreichte bei Cr2 100%. Eine Samenbehandlung mit Konidiensuspensionen allein ist anscheinend nicht geeignet, einen optimalen Schutz der Samen zu erreichen.

### Samenbehandlung mit *T. harzianum* (T-040) aus PDA- Medium in Alginat

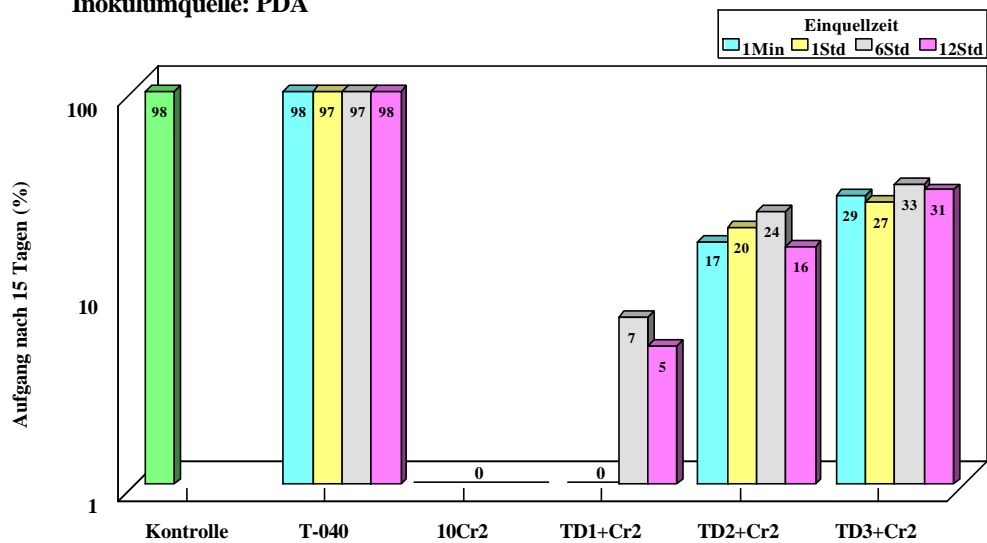
Das unter Laborbedingungen auf PDA- und Hirsekörnern gewonnene Inokulum des Antagonisten *T. harzianum* (T-040) wurde in speziellen Formulierungen und Applikationsverfahren als Saatgutbehandlung gegen *C. rolfii* angewendet. Bei der Aussaat wurden die Samen mit 10 Cr2 zusammengebracht. In diesem Versuch wurde die Wirkung von T-040 gegen *C. rolfii* in Abhängigkeit von der Menge der Konidiensuspensionen, der Inokulumquelle und der Einquellzeit untersucht. Für die Versuche wurden Mengen von Konidiensuspensionen/ml von  $5 \times 10^5$  (TD1),  $5 \times 10^6$  (TD2), und  $2 \times 10^7$  (TD3) eingestellt und in 2 % Alginat (Manutex) als Haftmittel verwendet. Die Samen von Bohnen wurden mit den Konidiensuspensionen von *Trichoderma* eine Minute, eine Stunde, sechs Stunden und zwölf Stunden lang eingequollen. Die Zahl der aufgegangenen Pflanzen wurde nach 7 Tagen (Abb. 25A) und 15 Tagen (Abb. 25B) ausgewertet.

**A Aufgang nach 7 Tagen**

Inokulumquelle: PDA

**B Aufgang nach 15 Tagen**

Inokulumquelle: PDA

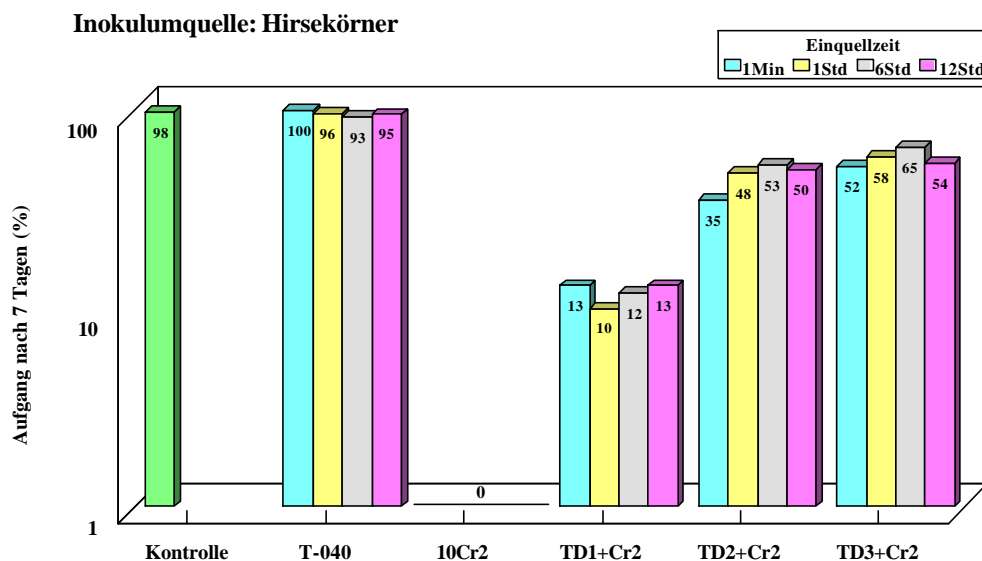


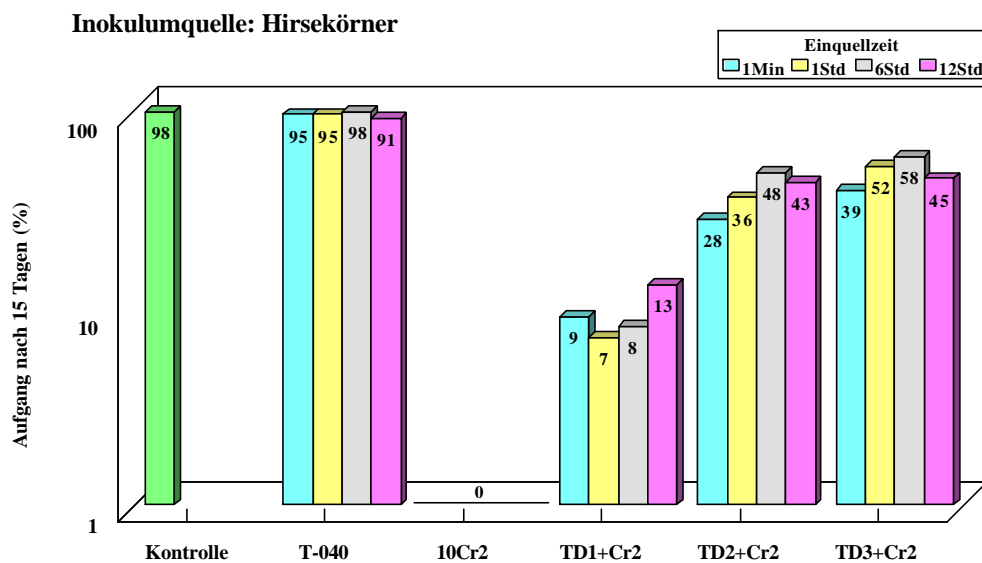
**Abb.25:** Einfluß der Inokulumquelle (PDA) auf die Wirkung von T-040 auf den Aufgang von Buschbohnen nach Inokulation mit *C. rolfii* (10Cr2) in Abhängigkeit von der Inokulumkonzentration von *Trichoderma* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (TD1=  $5 \times 10^5$ ; TD2 =  $5 \times 10^6$ ; TD3 =  $2 \times 10^7$  Konidien/ml), alle Suspensionen mit 2 % Alginat. Der Maßstab bei der Anzahl der Pflanzen wird logarithmisch dargestellt. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

Nach sieben Tagen war die Zahl der aufgegangenen Pflanzen bei den unterschiedlichen Behandlungen verschieden. Der Aufgangsschaden von *C. rolfii* war 100% bei den nicht mit *Trichoderma* behandelten Samen. Die Dosierungen von *Trichoderma* (TD2) und (TD3) hatten eine positive Wirkung bei der Bekämpfung von Cr2 im Vergleich zur Dosis TD1. Bei einer Einquellzeit von 6 Stunden wird in den behandelten Pflanzen eine maximale Aufgangsrate erreicht. Eine negative Wirkung von *Trichoderma* in Vergleich zur Kontrolle wurde nicht beobachtet. Nach 15 Tagen nahm die Zahl der keimenden Pflanzen in den verschiedenen Behandlungen ab. Bei der Behandlung TD1 erreicht der Befall von *C. rolfii* bei einer Minute und einer Stunde Einquellzeit 100% Mortalität. Im Vergleich zur Kontrolle sind die Gruppen signifikant verschieden. Bei dieser Untersuchung war die Wirkung des Antagonisten abhängig von der verwendeten Inokulumkonzentration. Darüberhinaus spielte die Einquellzeit eine besondere Rolle.

Für weitere Versuche wurde das Inokulum von *T. harzianum* von befallenen Hirsesamen hergestellt. Die Zahl der aufgehenden Pflanzen war nach 7 Tagen (Abb. 26a) und 15 Tagen (Abb. 26b) in den Gruppen verschieden. Bei der Behandlung TD3 wurde ein Wirkungsgrad von 65% von gekeimten und gesunden Pflanzen erreicht, der zu 58% nach 15 Tagen wieder abnahm. Die Wirkung des in Hirsekörnern erzeugten Inokulums von *Trichoderma* war deutlich besser als bei der Verwendung der PDA- Inokulumquelle.

#### A Aufgang nach 7 Tagen



**B Aufgang nach 15 Tagen**

**Abb. 26:** Einfluß der Inokulumquelle (Hirsekörner) auf die Wirkung von T-040 beim Buschbohnenaufgang nach Inokulation mit *C. rolfssii* (10HCr2) in Abhängigkeit von der Inokulumkonzentration von *Trichoderma* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (TD1 =  $5 \times 10^5$ ; TD2 =  $5 \times 10^6$ ; TD3 =  $2 \times 10^7$  Konidien/ml). Der Maßstab bei der Anzahl der Pflanzen wird logarithmisch dargestellt. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

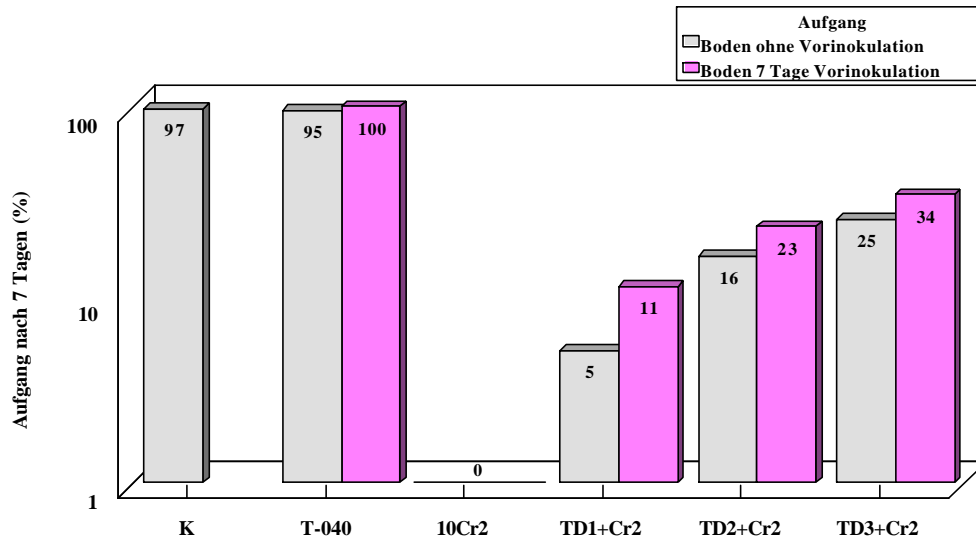
### Mit und ohne Vorinokulation des Bodens mit Konidiensuspensionen von *T. harzianum* (T-040) von PDA

Es wurde die Wirksamkeit von *Trichoderma* (T-040) in den entsprechenden Dosierungen (TD1, TD2 und TD3) in 7 Tage vorinokuliertem Boden und in Boden ohne Vorinokulation ermittelt. Dabei wurde der Einfluß der Inokulumproduktion - PDA oder gekochte Hirsekörner – auf die Wirkung des Antagonisten geprüft. Der Boden wurde mit 20 ml der Konzentrationen von *Trichoderma* inokuliert. Bei der Aussaat wurde das Inokulum des Erregers (10HCr2) inokuliert. Nach sieben Tagen war die Keimfähigkeit der Pflanzen beim vorinokulierten Boden höher als im Boden ohne Vorinokulation (Abb. 27a). Nach 15 Tagen verringerte sich die Wirkung von *Trichoderma* im vorinokulierten Boden deutlich, und die Zahl der abgestorbenen Pflanzen war höher als im Boden ohne Vorinokulation (Abb. 27b). Die gute antagonistische Wirkung von *Trichoderma*, die bei 7 Tage vorinokuliertem Boden beobachtet wurde, ist wahrscheinlich auf die noch andauernde Anpassung der Populationen von *Trichoderma* an die neue Umgebung zurückzuführen. Der Pilz kann weiter wachsen, wenn er keine Konkurrenz um Nahrung und Raum hat. Als die Bohnensamen mit dem Pathogen inokuliert wurden, gab es im Substrat bereits eine große Population von *Trichoderma*, die in der Lage war, die Entwicklung des Pathogens teilweise zu verhindern. Erst nach 15 Tagen wechselte der Effekt der Vorinokulation und die Zahl der Mortalität der Pflanzen nahm zu. *C. rolfssii* war fähig, den Antagonismus und/oder Parasitismus von *Trichoderma* auszuhalten und wuchs in kurzer Zeit sehr schnell. An diesem Punkt war *Trichoderma* gegen *C. rolfssii* nicht mehr wirksam.

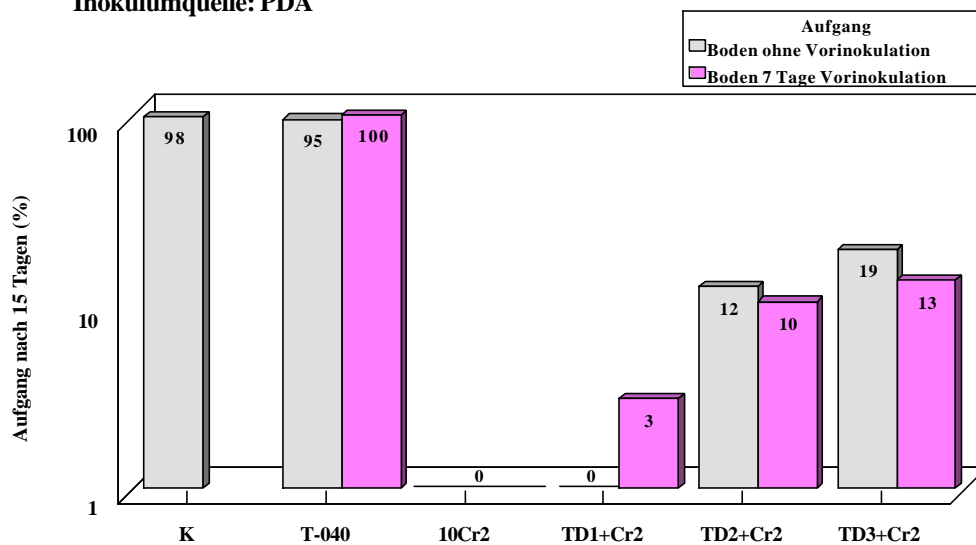


**A Aufgang nach 7 Tagen**

Inokulumquelle: PDA

**B Aufgang nach 15 Tagen**

Inokulumquelle: PDA



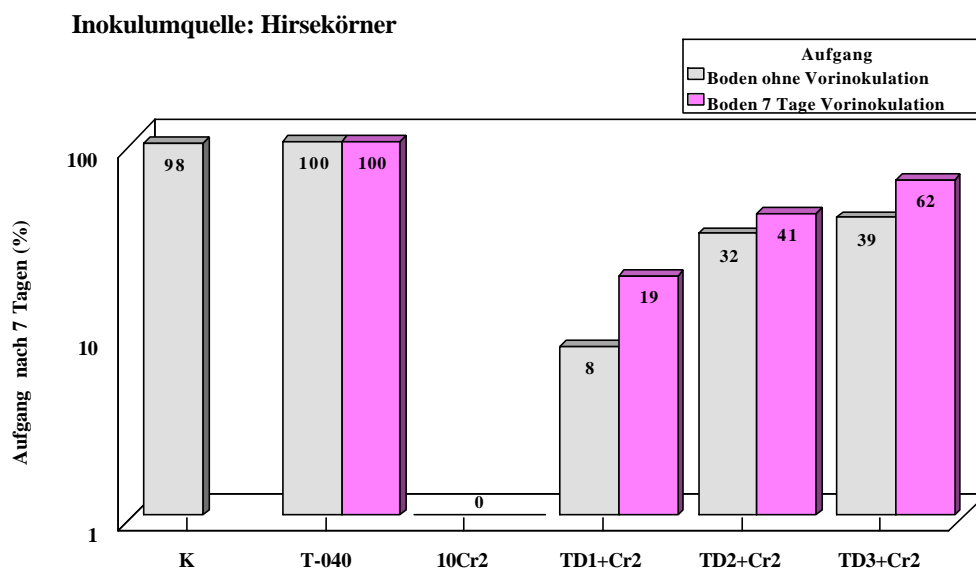
**Abb. 27:** Einfluß der Inokulumquelle (PDA) auf die Wirkung von T-040 beim Aufgang von Buschbohnen 7 und 15 Tage nach Inokulation mit *C. rolfssii* (10HCr2) bei unterschiedlichen Inokulumkonzentrationen und Inokulationszeiten von *Trichoderma* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (TD1=  $5 \times 10^5$ ; TD2 =  $5 \times 10^6$ ; TD3 =  $2 \times 10^7$  Konidien/ml). Der Maßstab bei der Anzahl der Pflanzen wird logarithmisch dargestellt. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

### Mit und ohne Vorinokulation des Bodens mit Konidiensuspensionen von *T. harzianum* (T-040) von Hirsekörnern

Bei Verwendung von Hirsekörnern als Nahrungsquelle ist die Wirksamkeit von *Trichoderma* (T-040) gegen *C. rolfssii* höher als bei Verwendung eines PDA-Inokulums. Die verschiedenen Konzentrationen von *Trichoderma* wurden im Boden bei sieben Tagen Vorinokulation und

ohne Vorinokulation getestet. Die aufgelaufenen Pflanzen erreichten 62 % gesunde Pflanzen bei vorinokuliertem Boden gegenüber 39% gesunden Pflanzen bei nicht vorinokuliertem Boden (Abb. 28a). Die Wirkung von *Trichoderma* war nach 15 Tagen bei vorinokuliertem Boden immer noch höher als ohne Vorinokulation (Abb. 28b). Beim Boden ohne Vorinokulation wurden die Bohnensamen gleichzeitig mit dem Pathogen und *Trichoderma* inokuliert. Hier zeigte sich, daß die Zahl der aufgegangenen Pflanzen geringer war als bei vorinokuliertem Boden, jedoch höher als bei dem mit einem PDA – Inokulum behandelten Boden (Abb. 25a).

### A Aufgang nach 7 Tagen



### B Aufgang nach 15 Tagen

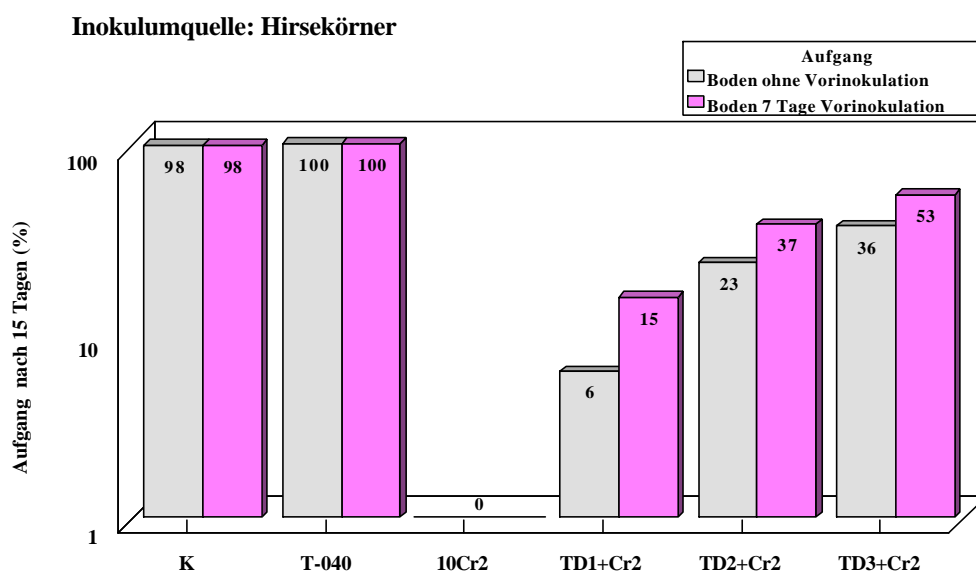
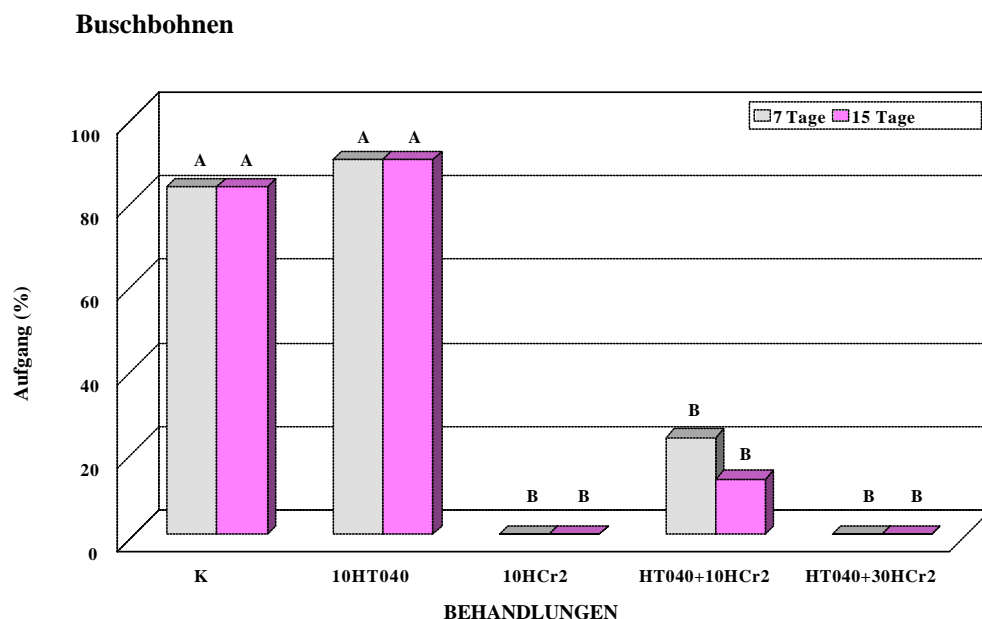


Abb. 28: Einfluß der Inokulumquelle (Hirsekörner flüssig) auf die Wirkung von T-040 beim Aufgang von Buschbohnen nach Inokulation mit *C. rolfii* (10HCr2) bei unterschiedlichen Inokulumkonzentrationen und Inokulationszeiten von *Trichoderma* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (TD1=  $5 \times 10^5$ ; TD2 =  $5 \times 10^6$ ; TD3 =  $2 \times 10^7$  Konidien/ml). Der Maßstab bei der Anzahl der Pflanzen wird logarithmisch dargestellt. Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.

In diesen Versuchen wurden der Einfluß und der Effekt von Hirsekörnern als Nahrungsquelle für die Inokulumproduktion von *Trichoderma* im Vergleich mit dem in PDA-Nährmedium hergestellten Inokulum nachgewiesen und die Bedeutung der Vorinokulation gezeigt.

### Hirsekörner als Inokulum von *Trichoderma* (T-040)

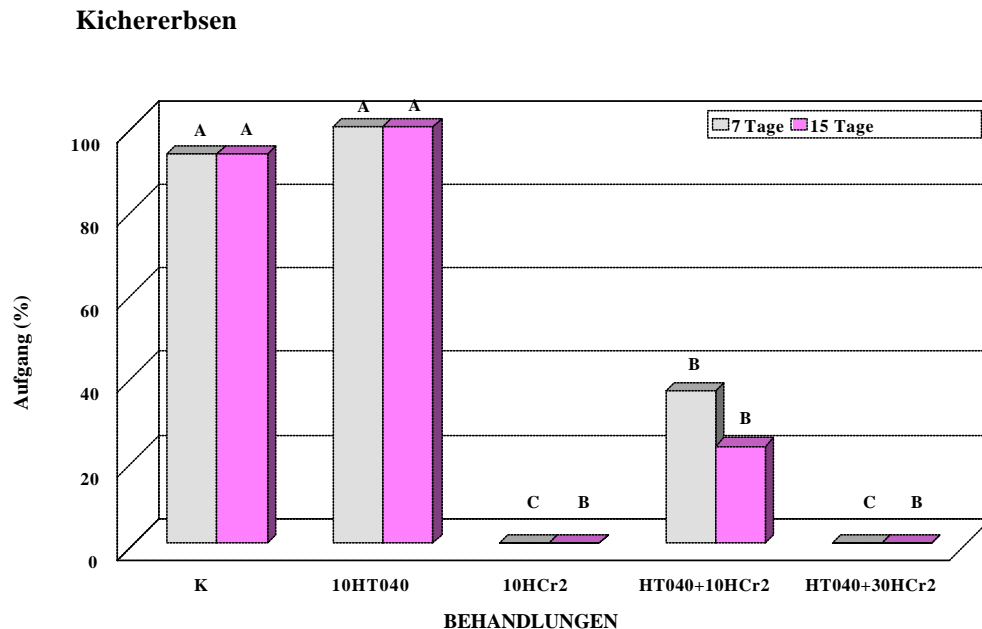
Bei dieser Untersuchung wurde durch eine Applikation von gekochten Hirsekörnern als Inokulum von *Trichoderma* ihre Wirksamkeit gegen *C. rolfii* bei Bohnen- und Kichererbsenpflanzen im Boden überprüft. Bei der Aussaat wurden die Samen mit dem Inokulum von *Trichoderma* in einer Menge von 10 bewachsenen Körnern (10HT) und mit dem Inokulum des Pathogens zusammengebracht. Es wurden zwei verschiedene Inokulummengen von *C. rolfii* (10H Cr<sub>2</sub> und 30H Cr<sub>2</sub>) verwendet. Die Verwendung von Hirsekörnern als Inokulumträger von *Trichoderma* brachte keinen deutlichen Erfolg gegen *C. rolfii*. Trotz einer Auflaufrate von 23 % gesunden Pflanzen bei der Behandlung (10HT-040 + 10H Cr<sub>2</sub>), gab es keine statistische Signifikanz bei den einzelnen Behandlungen, bei denen nur der Erreger (10H Cr<sub>2</sub>) inokuliert worden war oder bei denen die Inokulummenge des Pathogens zu (30H Cr<sub>2</sub>) verwendet wurde (Abb. 29a). Wie bei anderen Versuchen nahm auch in diesen Versuchen die Zahl der Pflanzen nach 15 Tagen ab. Eine Zunahme des Inokulums von *C. rolfii* verursachte 100 % Mortalität an Bohnen, obwohl *Trichoderma* inokuliert wurde.



**Abb. 29a:** Wirksamkeit von (10H) Hirsekörnern - mit *Trichoderma harzianum* (T-040) gegen unterschiedliche Inokulummengen von *C. rolfii* an Buschbohnen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.  
Pflanzensubstrat: Kompost LD-80.  
Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

Bei der Anwendung von *Trichoderma* auf Hirsekörnern zur Bekämpfung von *C. rolfii* (10HCr<sub>2</sub>) bei Kichererbsen war die Wirkung statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich mit den anderen Behandlungen. Nach sieben Tagen war eine Wirkung von 36 % vorhanden, die nach 15 Tagen nur noch 23 % betrug (Abb. 29b). Bei der höheren

Inokulummenge von *C. rolfii* wirkte *Trichoderma* nicht. Sowohl bei Bohnen als auch bei Kichererbsen hatte eine Inokulation von *Trichoderma* an Hirsekörnern eine positive Auswirkung auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen, obwohl es keine signifikanten Unterschiede in bezug auf die Keimfähigkeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gab.



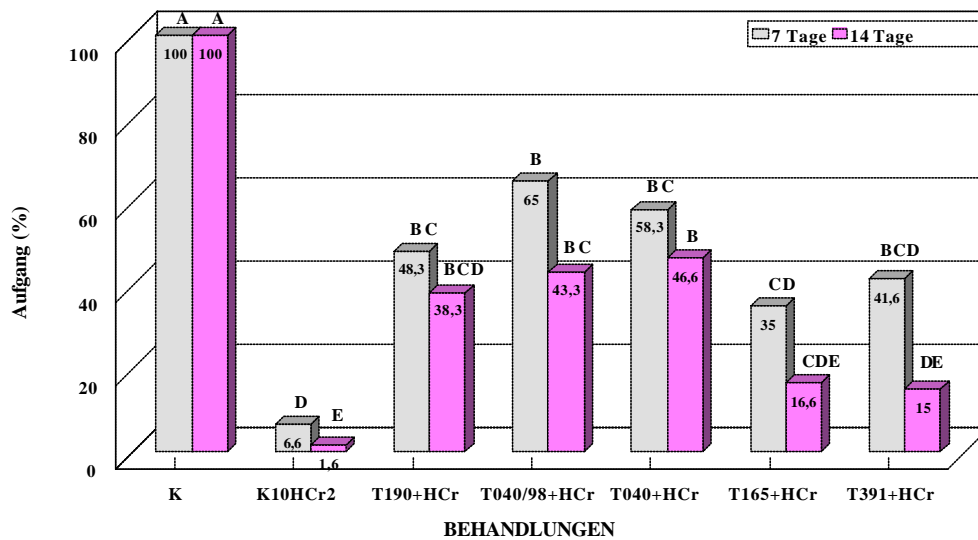
**Abb. 29b:** Wirksamkeit von (10HT) Hirsekörnern mit *Trichoderma harzianum* (T-040) gegen unterschiedliche Inokulummengen von *C. rolfii* an Kichererbsen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

**Pflanzensubstrat:** Kompost LD-80.

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

### 3.5.4 Wirksamkeit einiger *Trichoderma*-Arten gegen *C. rolfii*

Es wurde die Wirksamkeit verschiedener ausgewählter *Trichoderma*-Arten ermittelt. Für den Versuch wurde frisches Inokulum von *Trichoderma*-Arten an gekochten Hirsekörnern hergestellt und in einer mittleren Konzentration (TD2) – wie bei vorangegangenen Experimenten - verwendet. Das Inokulum der *Trichoderma* spp. wurde bei der Aussaat im Boden appliziert. Als eine Variante wurde auch die Wirksamkeit einer Konidiensuspension von T-040 getestet, wobei der Pilz auf Hirsekörnern erzeugt und ein Jahr lang bei 5 °C gelagert worden war. Zwischen dem Inokulum der Antagonisten T-040/98 (ein Jahr alt) und T-040 (frisches Inokulum) gab es einen signifikanten Unterschied in bezug auf den Aufgang. Das ein Jahr alte Inokulum von T-040 zeigte eine bessere Wirkung im Aufgang. Sowohl das alte als auch das neue Inokulum von T-040 erreichten nach 7 Tagen im Vergleich mit den anderen *Trichoderma*-Arten eine höhere Wirkung (65% und 58%). Nach 15 Tagen war bei allen Behandlungen der Befall von *C. rolfii* stärker und die Wirksamkeit von *Trichoderma*-Inokulum geringer als nach 7 Tagen (Abb. 30).



**Abb. 30:** Wirksamkeit von *Trichoderma*-Arten und Vergleich zur Wirkung eines ein Jahr alten und eines frischen Inokulums von T-040 gegen *C. rolfii* (10HCr2) an Buschbohnen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (TD2 =  $5 \times 10^6$  Konidien/ml). Pflanzensubstrat: Kompost LD-80. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).  
 (T-040)/98-*Trichoderma harzianum* (1 Jahr alt bei 5 °C)  
 (T-040)-*Trichoderma harzianum*  
 (T-165)-*Trichoderma koningii*  
 (T-190)-*Trichoderma viride*  
 (T-391)-*Trichoderma harzianum*

Die *Trichoderma*-Arten T-040 (frisches Inokulum) und T-190 wiesen keine statistische Signifikanz auf, unterschieden sich jedoch von den *Trichoderma*-Arten T-165 und T-391. Wie in den vorangegangenen Versuchen konnte auch hier gezeigt werden, daß *Trichoderma* in den ersten 10 Tagen effektiv gegen *C. rolfii* ist, die Wirkung aber abnimmt. *C. rolfii* verursacht aufgrund seiner Aggressivität, Anpassungsfähigkeit und einer besseren Etablierung im Boden eine Zunahme der Mortalität der Pflanzen.

### 3.6 Induzierbare Resistenz

#### 3.6.1 Phytotoxizität von BION® WG 50 bei Pflanzen

Der Substratboden, die Samen und die Laubblätter der Pflanzen wurden mit BION® behandelt, um eine mögliche Phytotoxizität des Resistenzinduktors zu ermitteln. Hierfür wurden die Wirkungen der Konzentrationen von 5, 10, 20 und 40 µg/ml von BION® WG 50 untersucht. Bei der Untersuchung wurden die Samen zwischen eine und zwölf Stunden eingequollen, anschließend ausgesät. In anderen Versuchen wurde das Laubwerk der Pflanzen mit den verschiedenen Konzentrationen von BION® besprüht. In weiteren Experimenten wurde BION® in den entsprechenden Konzentrationen und in verschiedenen Mengen (ml) in den Boden gegossen. Anhand des Auflaufes und der Pflanzenhöhe wurde die Wirkung des Resistenzinduktors BION® WG 50 evaluiert.

#### Samenbehandlung

Bei diesem Test wurden die Buschbohnsensamen in 20 und 40 µg/ml Lösungen von BION® WG 50 für 1-12h eingequollen und nach Aufgang und Pflanzenhöhe ermittelt. Es zeigte sich, daß sich der Auflauf in beiden Konzentrationen verringerte, je länger die Einquellzeit war, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (Tab. 22). In bezug auf die Pflanzenlänge gab es dagegen einen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Einquellzeiten und der unbehandelten Kontrolle. Bei den entsprechenden Dosierungen von BION® WG 50 und Einquellzeiten von 1 bis 4 Stunden wurde das Flächenwachstum der Keimblätter und der Pflanzen gefördert. Symptome einer phytotoxischen Wirkung wurden bei 20 und bei 40 µg/ml und ab 8 Stunden Einquellzeit beobachtet. Die Pflanzen wiesen einen sichtbaren Zwergwuchs und dünnere Stengel auf.

**Tab. 22: Aufgang und Pflanzenlänge von Buschbohnen nach Samenbehandlung mit BION® WG 50. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).**

Behandlung		Auflauf (%) nach 15 Tagen				
BION® WG 50	K	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h
20 µg/ml	93,3 a	93,3 a	96,6 a	96,6 a	93,3 a	83,3 a
40 µg/ml	93,3 a	96,6 a	96,6 a	96,6 a	90 a	80 a
Behandlung		Pflanzenlänge (cm) nach 15 Tagen				
BION® WG 50	K	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h
20 µg/ml	27,8 ab	32,8 a	31 ab	29,4 abc	26 cd	23,2 d
40 µg/ml	27,8 ab	30,2 a	29,6 ab	30 ab	25,8 c	22,8 c

## Laubblätterbehandlung

Hier wurden die Pflanzen von Buschbohnen, Kichererbsen, Linsen und Erbsen nach dem Aufruf mit verschiedenen Konzentrationen des Resistenzinduktors **BION® WG 50** besprüht. Eine mögliche Phytotoxizität wurde 15 Tage später anhand der Pflanzenhöhe und weiterer sichtbarer Symptome ermittelt. Eine Zunahme des Wachstums wurde in allen Kulturen abhängig von den entsprechenden Dosierungen von BTH gefördert (Tab. 23). Doch gab es bei Buschbohnen und Erbsen keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungen und der unbehandelten Kontrolle. Kichererbsenpflanzen, die mit 5 µg/ml behandelt wurden, wuchsen etwas besser als die unbehandelte Kontrolle, verringerten sich aber in ihrer Größe, sobald die Dosierungen erhöht wurden. Die Pflanzenhöhe von Linsen war bei der Kontrolle signifikant größer als bei den behandelten Pflanzen. Bei Bohnen wurde beobachtet, daß die Pflanzen Applikationen von 5 bis 20 µg/ml gut vertragen können und darüberhinaus das Wachstum der Blattfläche gefördert wird. Die Anwendung von 40 µg/ml führte zur Bildung brauner Flecken, eingerollten Blättern und Chlorosen. Bei Linsen- und Kichererbsen wurde bei Anwendung der gleichen Menge neben einer Wuchsdepression die Bildung kleinerer Blätter beobachtet. In Gegensatz dazu zeigten Erbsenpflanzen bei den verwendeten Konzentrationen keine sichtbaren Symptome.

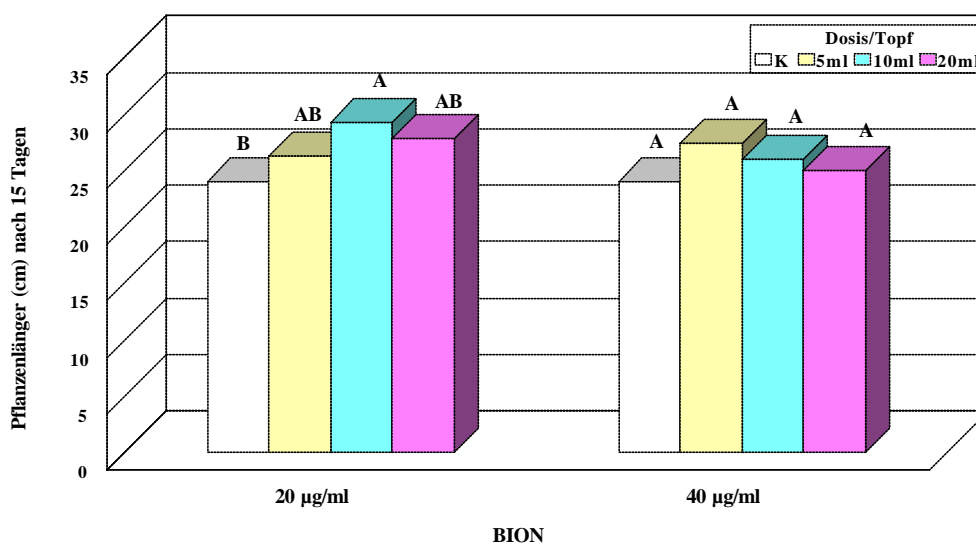
**Tab. 23: Pflanzenhöhe (cm) von Buschbohnen, Kichererbsen, Linsen und Erbsen nach Blätterbehandlung mit BION® WG 50 in verschiedenen Konzentrationen. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen.**

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

BEHANDLUNGEN					
BION® WG 50	K	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml
<b>Bohnen</b>					
	24,8 a	24,9 a	25,6 a	26,9 a	23,9 a
<b>Kichererbsen</b>					
	27,4 a	27,8 a	26,5 ab	25,2 b	24,6 b
<b>Linsen</b>					
	24,3 a	23 ab	23,5 ab	22,1 b	21,8 b
<b>Erbsen</b>					
	28,5 a	28,3 a	27,9 a	29 a	28,1 a

### Bodenbehandlung nach dem Aufgang der Pflanzen

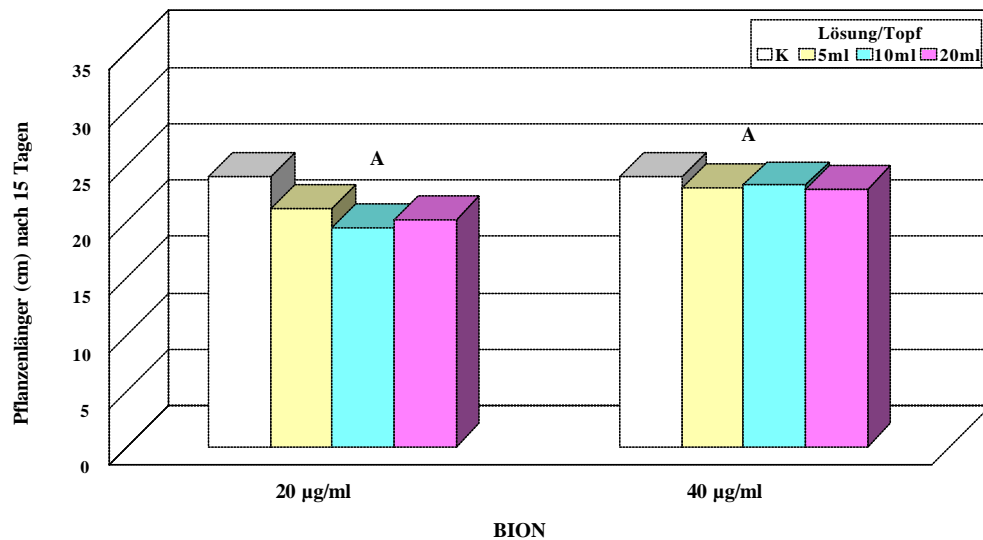
Hier wurde die Wirkung von BION® WG 50 in den Konzentrationen 20 und 40 µg/ml untersucht. Die Lösungen wurden in Mengen von 5, 10 und 20 ml ein Mal nach dem Aufgang der Keimlinge in den Boden gegossen. Bei der Anwendung von BTH im Boden können die Wurzeln der Pflanzen dieses besser aufnehmen und in der ganzen Pflanze verteilen. Die Ergebnisse zeigen bei 20 µg/ml Lösungen in Mengen von 5 und 10 ml ein signifikantes Wachstum der Pflanzen. Bei 20 ml wurde kein weiterer Anstieg der Pflanzenhöhe beobachtet. Eine Dosis von 40 µg/ml in Mengen von 5 ml verursachte ebenfalls eine Zunahme des Wachstums im Vergleich zu 10 und 20 ml, dieser war aber nicht signifikant (Abb. 31a). Chlorosen oder andere negative Auswirkungen wurden nicht beobachtet, stattdessen gab es eine verbesserte Entwicklung des Laubwerks.



**Abb. 31a:** Wirkung der Konzentrationen von BION® WG 50 auf die Pflanzenlänge (cm) von Buschbohnen nach Bodenbehandlung in mehreren Varianten. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Bohnenpflanzen eine Überdosierung von BTH im Boden vertragen können und welche negativen Auswirkungen dieses auf die Pflanzen hat. Dafür wurde der Boden mit den entsprechenden Mengen und Konzentrationen von BION® WG 50 zwei Mal nach dem Auflauf gegossen. Eine Zunahme des Wachstums und weitere Symptome traten nicht auf (Abb. 31b). Die Pflanzenlänge zeigte bei den verschiedenen Behandlungen und Varianten keine signifikanten Unterschiede.





**Abb. 31b:** Wirkung der Konzentrationen von BION® WG 50 auf die Pflanzenlänge (cm) von Buschbohnen nach zweimaliger Bodenbehandlung in mehreren Varianten. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

### Bodenbehandlung vor und nach dem Aufgang der Pflanzen

Um weitere Informationen über BION® WG 50 und seine Verträglichkeit sowie eine mögliche Phytotoxizität in den Pflanzen zu gewinnen, wurden in den weiteren Versuchen die vorher verwendeten Konzentrationen und Mengen von BTH vor und nach dem Aufgang der Keimlinge im Boden gegossen. Abb. 32 zeigt eine Tendenz der Verringerung des Pflanzenwachstums je höher die Konzentration und die Menge sind. Die Anwendung von BTH in diesem Versuch hat somit Einfluß auf die Keimfähigkeit. Es wurden keine sichtbaren phytotoxischen Wirkungen beobachtet.

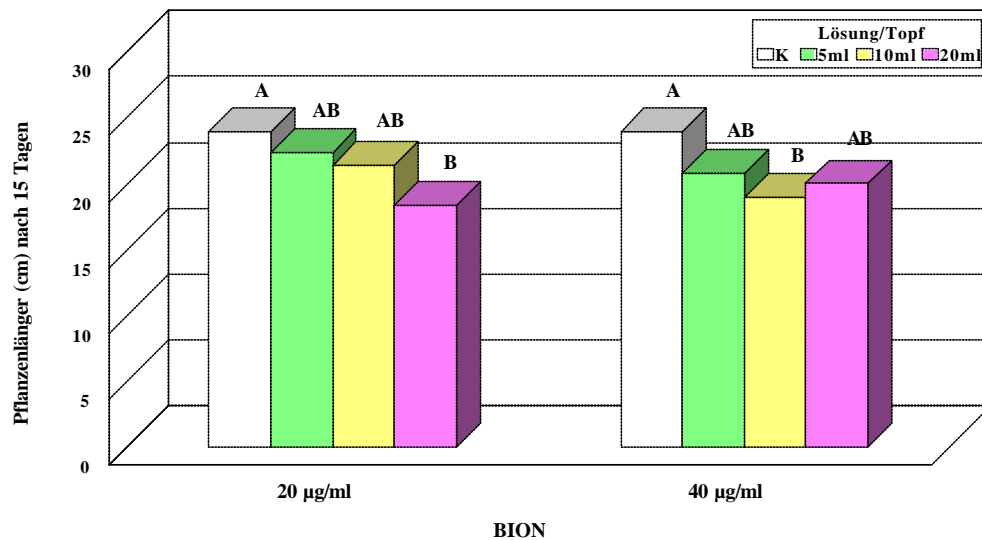


Abb. 32: Wirkung der Konzentrationen von BION® WG 50 auf die Pflanzenlänge (cm) von Buschbohnen nach Bodenbehandlung vor und nach dem Aufgang in mehreren Varianten. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

### 3.6.2 Untersuchung der Phytotoxizität von BION® 100 EC bei Pflanzen

Um eine eventuelle phytotoxische Wirkung des pflanzlichen Resistenzinduktors BION® 100 EC zu ermitteln, wurde er bei den Kulturen Buschbohnen, Kichererbsen und Ackerbohnen unter mehreren Varianten und bestimmten Konzentrationen eingesetzt.

#### Samenbehandlung

Samen der verschiedenen Kulturen wurden mit BION® 100 EC Lösungen von 12,5-25-50-100- und 200 µg/ml als Saatgutbeizung verwendet. Eine positive oder negative Wirkung auf die Keimfähigkeit und Pflanzenhöhe wurde geprüft (Tab. 24). Die Keimfähigkeit der verschiedenen Kulturen nach den Behandlungen wies keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Es wurde aber eine Verringerung der Keimfähigkeit bei Bohnen und Kichererbsen beobachtet. Jedoch wurde eine sehr deutliche negative Wirkung des Produktes auf das Pflanzenwachstum beobachtet und es trat eine Reihe weiterer Symptome auf. Während die Konzentrationen von 12,5 bis 25 µg/ml keine phytotoxischen Effekte auf Bohnen und Kichererbsen hatten, führten höhere Konzentrationen zu Wuchsdepressionen sowie Farb- und Formveränderungen in den Kulturen. Bei Ackerbohnen wurde dagegen bei keiner der Behandlungen eine Wirkung auf die Pflanzenlänge im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

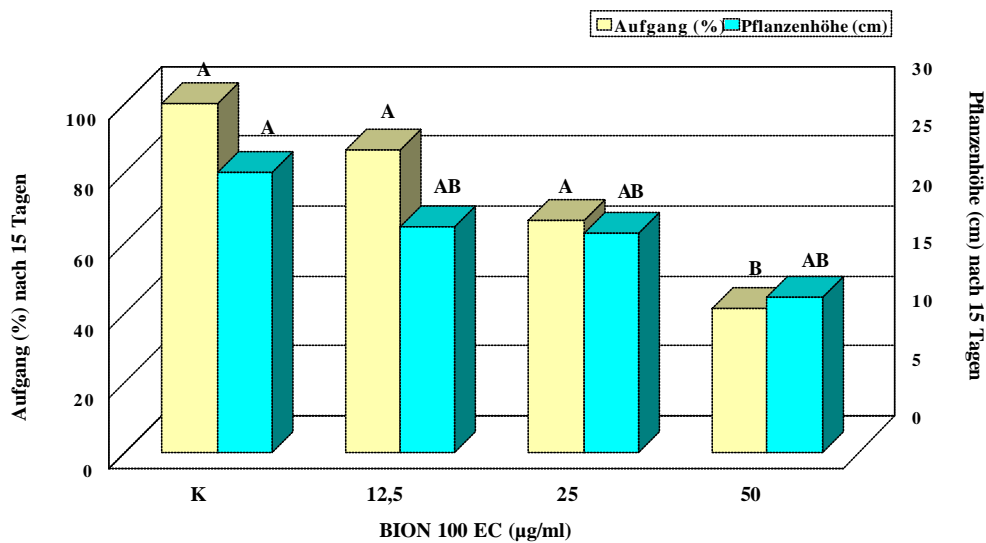
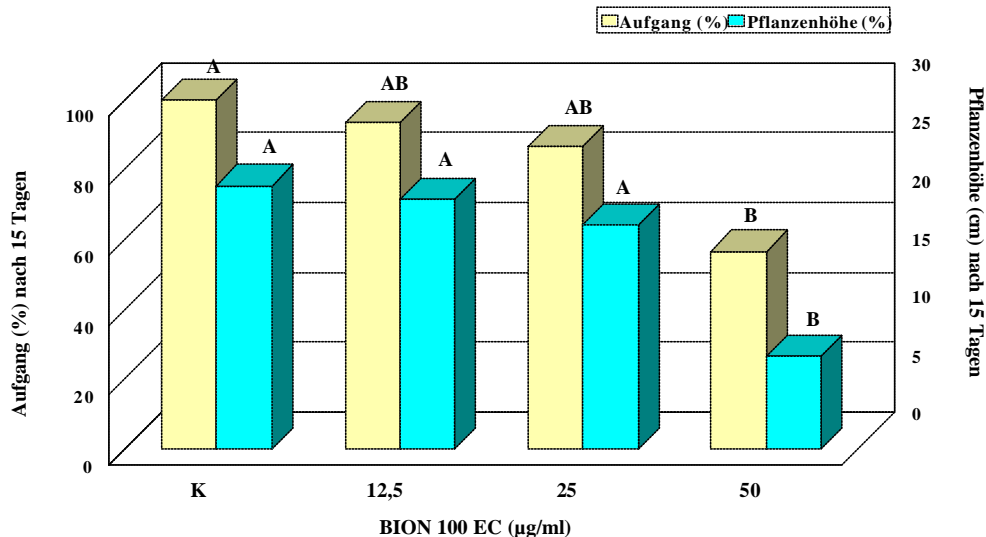
**Tab. 24: Aufgang (%) und Pflanzenhöhe (cm) von Buschbohnen, Kichererbsen, und Ackerbohnen nach Samenbehandlung mit BION® 100 EC in verschiedenen Konzentrationen. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen.**

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

Behandlung	Buschbohnen		Kichererbsen		Ackerbohnen	
	Auflauf (%)	Pflanzenlänge (cm)	Auflauf (%)	Pflanzenlänge (cm)	Auflauf (%)	Pflanzenlänge (cm)
<b>K</b>	96,6 <b>a</b>	20,4 <b>a</b>	90 <b>a</b>	23,4 <b>a</b>	100 <b>a</b>	21 <b>a</b>
<b>W</b>	100 <b>a</b>	20,2 <b>a</b>	90 <b>a</b>	24,4 <b>a</b>	93,3 <b>a</b>	22 <b>a</b>
<b>12,5</b>	96,6 <b>a</b>	19,6 <b>a</b>	90 <b>a</b>	22,4 <b>a</b>	100 <b>a</b>	23,8 <b>a</b>
<b>25</b>	93,3 <b>a</b>	19,4 <b>a</b>	93,3 <b>a</b>	23 <b>a</b>	96,6 <b>a</b>	23,4 <b>a</b>
<b>50</b>	100 <b>a</b>	18 <b>ab</b>	90 <b>a</b>	17,4 <b>b</b>	100 <b>a</b>	21,8 <b>a</b>
<b>100</b>	93,3 <b>a</b>	16 <b>b</b>	73,3 <b>ab</b>	12,6 <b>c</b>	96,6 <b>a</b>	21,4 <b>a</b>
<b>200</b>	86,6 <b>a</b>	11 <b>c</b>	66,6 <b>b</b>	9 <b>d</b>	96,6 <b>a</b>	21 <b>a</b>

#### **Phytotoxizität von BION® 100 EC nach Samenbehandlung von Buschbohnen und Kichererbsen**

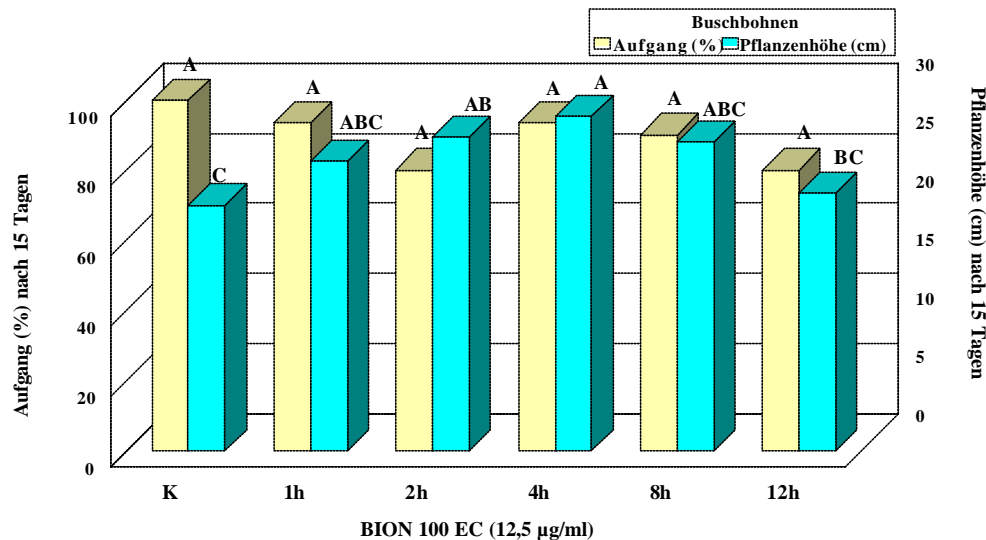
In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung von 12,5-25 und 50 µg/ml von BION® 100 EC ermittelt, nachdem die Samen mit einer Bionlösung 9 Stunden lang behandelt wurden. Es wurden 0,5 ml/100g Samen der entsprechenden Konzentrationen des Produktes verwendet. **Abb 33a** und **Abb 33b** zeigen deutlich, daß sich die Keimfähigkeit von Bohnen und Kichererbsenpflanzen signifikant unterscheidet von der unbehandelten Kontrolle. Dabei spielte sowohl die Konzentration als auch die Behandlungszeit eine entscheidende Rolle. Auch in bezug auf die Pflanzenhöhe zeigten beide Kulturen einen signifikanten Unterschied. Je höher die Konzentration von BION®, desto deutlicher war die Verringerung der Größe der Pflanzen. Die Verwendung von 50 µg/ml BTH bei solchen Bedingungen war sehr toxisch und kritisch für die Pflanzen. Bei der Anwendung in der Praxis ist daher zu beachten, daß das Produkt auf unterschiedliche Kulturpflanzen unterschiedlich – positiv oder negativ - wirken kann.

**Buschbohnen****Kichererbsen**

**Abb. 33:** Aufgang (%) und Pflanzenhöhe (cm) von Buschbohnen und Kichererbsen nach 9 Stunden Samenbehandlung mit BION® 100 EC in verschiedenen Konzentrationen. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

Nach den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche wurde die Konzentration von **12,5 µg/ml (BION® 100EC)** anhand des Kriteriums „niedrigste phytotoxische Wirkung“ ausgewählt. Die Bohnensamen wurden in der Lösung des Produktes (0,5 ml/100g Samen) vor der Aussaat von 1 bis 12h behandelt. Dabei wurde die Wirkung der Konzentration auf Keimfähigkeit und Pflanzenlänge ermittelt. Bei den verschiedenen Behandlungen wies die Keimfähigkeit trotz einer sichtbar verbesserten Wirkung mit dem Produkt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Unterschied auf. Bei der Pflanzenhöhe gab es dagegen einer deutliche Schwankung der Werte zwischen den behandelten Pflanzen und der Kontrolle. Eine

optimale Wirkung sowohl für die Keimfähigkeit als auch die Pflanzenlänge wurde bei 4h Samenbehandlung erzielt. Eine Tendenz zur Verringerung der Keimung und der Pflanzenhöhe lag bei 8h Behandlung vor (Abb. 34).



**Abb. 34:** Aufgang und Pflanzenlänge der Buschbohnen nach Samenbehandlung mit 12,5 µg/ml BION<sup>®</sup> 100 EC vor der Aussaat in Abhängigkeit von verschiedenen Zeiten. Die Auswertung erfolgte nach 15 Tagen.

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

### 3.6.3 Induzierte Resistenz gegen *C. rolfii*

Mit Hilfe von BION<sup>®</sup> WG 50 und BION<sup>®</sup> 100 EC wurde versucht, die Abwehrmechanismen von Pflanzen gegenüber dem Pathogen *C. rolfii*, dessen Ernährungs- und Lebensweise pertotroph erfolgt, zu aktivieren. In den verschiedenen Experimenten wurden Buschbohnen, Kichererbsen, Linsen, Erbsen und Ackerbohnen verwendet. Für die Inokulation der Pflanzen wurde natürliches (Sklerotien) oder künstliches Inokulum des Pilzes (bewachsene Hirsesamen) verwendet. Da der Erreger sehr aggressiv ist und in kurzer Zeit zum Absterben der Pflanzen führt, wurde unter Anwendung mehrerer Varianten und Applikationsformen von BTH die Wirkung der induzierten Resistenz anhand des Auflaufes innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Aussaat untersucht. In den meisten Fällen wurde ein Befall von *C. rolfii* fünf Tage nach der Inokulation beobachtet.

### Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen von BION<sup>®</sup> WG 50 zur Resistenzinduktion von behandelten Bohnen- Kichererbsen- und Linsensamen gegen *C. rolf sii* (HCr<sub>2</sub>) nach 6 Stunden Einquellzeit

Da die Samen oder die Keimlinge in den bisherigen Experimenten bereits vor dem Aufgang durch den Pathogen angegriffen werden, wurde das Inokulum des Erregers diesmal auf die Bodenoberfläche gelegt und leicht mit Erde bedeckt. Auf diese Weise wurde vermieden, daß der Pathogen und die Samen direkten Kontakt haben. Vor der Aussaat wurden die Samen zunächst bei 5, 10, 20 µg/ml Konzentrationen BION<sup>®</sup> WG 50 6 Stunden lang behandelt. Während der Behandlung und der Keimung sollte eine Induktionsphase der Resistenz stattfinden. Ob in den Pflanzen die notwendigen Abwehrmechanismen gegen den Angriff des Pilzes induziert und effektiv waren, wurde bei behandelten Samen von Buschbohnen, Kichererbsen und Linsen nach Inokulation mit *C. rolf sii* ermittelt (Abb. 35a, 35b, 35c). Die Buschbohnen wurden bei der Aussaat mit 5HCr<sub>2</sub> oberflächlich inokuliert. Nach 10 Tagen zeigten die mit BTH behandelten Pflanzen einen maximalen Prozentsatz Mortalität oder abgestorbene Pflanzen von 15 % gegenüber 23 % bei den nur mit dem Pathogen inokulierten Pflanzen. Nach 20 Tagen erreicht der Befall von *C. rolf sii* 33% bei den behandelten Pflanzen und 63% bei den nur mit dem Erreger konfrontierten Pflanzen. Eine Verringerung des Angriffes bei den nur mit Wasser behandelten Pflanzen ist unklar (Abb. 35a). Da die Anzahl der befallenen Pflanzen nach 20 Tagen zugenommen hat, ist dies wahrscheinlich auf eine Verringerung der Wirkung der Induzierten Resistenz zurückzuführen.

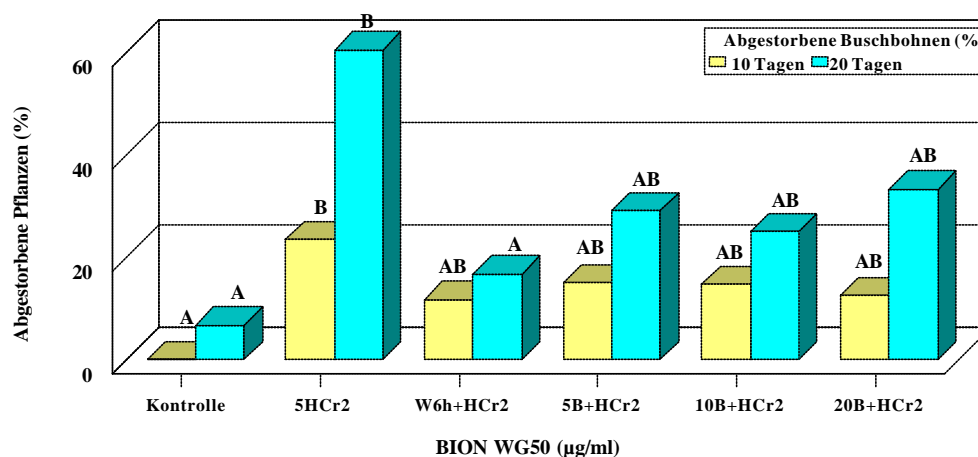
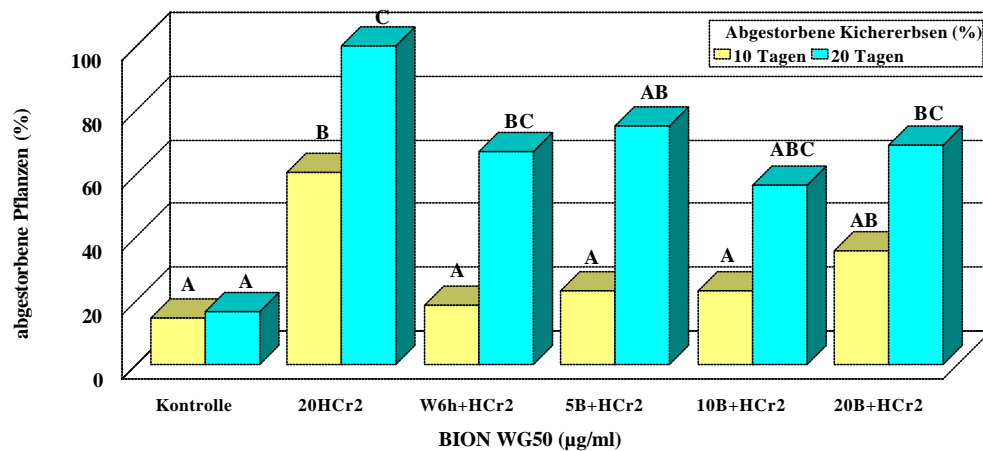


Abb. 35a: Wirksamkeit der Induzierten Resistenz gegen *C. rolf sii* an Buschbohnen nach Samenbehandlung mit 5, 10 und 20 µg/ml BION<sup>®</sup> WG 50 bei 6 Stunden Behandlungszeit. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

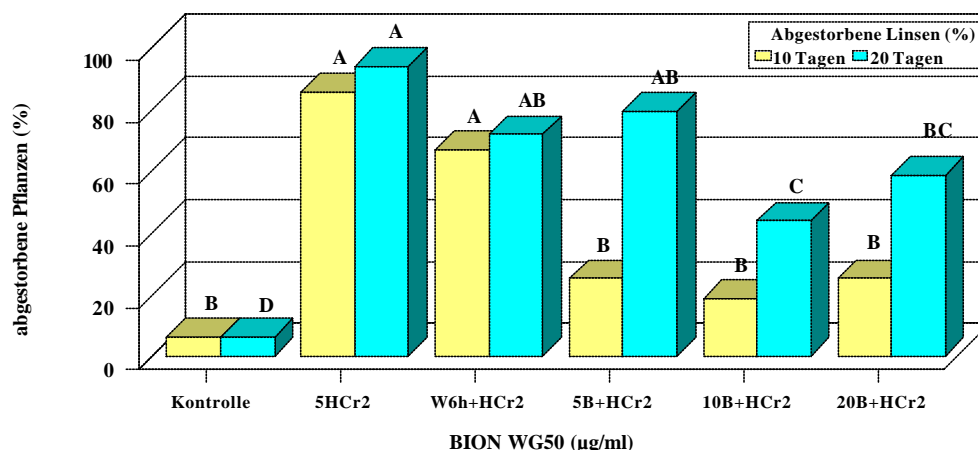
Die Wirksamkeit der Induzierten Resistenz bei mit BTH behandelten Kichererbsenpflanzen nach Inokulation von 20HCr<sub>2</sub> erreichte eine deutliche Befallreduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Darüberhinaus lag die Schadensrate durch *C. rolf sii* bei 35 % bei Pflanzen, die mit 20 µg/ml Bion, bei 23 % bei Pflanzen, die mit 5 und 10 µg/ml Bion behandelt wurden. Bei der Behandlung der Pflanzen nur mit dem Pathogen erreichte die Mortalität der Pflanzen 60 % und nach 20 Tagen 100 %. Der Schutz, den BTH den Pflanzen in den ersten 10 Tagen verleiht, verringerte sich aber nach 20 Tagen und die Zahl der abgestorbenen Pflanzen stieg auf 68%. Wenn BION<sup>®</sup> wirklich einen Schutz gegen den Befall pilzlicher Erreger bietet, dauert dieser also nur eine bestimmte Zeit, in der die Pflanzen obendrein sehr anfällig sind. Nach einiger Zeit variiert die Wirkung der induzierten Resistenz.

Als Folge sind die Pflanzen nicht mehr in der Lage, sich gegen den Angriff des Pathogens zu schützen (Abb. 35b).



**Abb. 35b:** Wirksamkeit der Induzierten Resistenz gegen *C. rolfii* an Kichererbsen nach Samenbehandlung mit 5, 10 und 20 µg/ml BION® WG 50 bei 6 Stunden Behandlungszeit. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

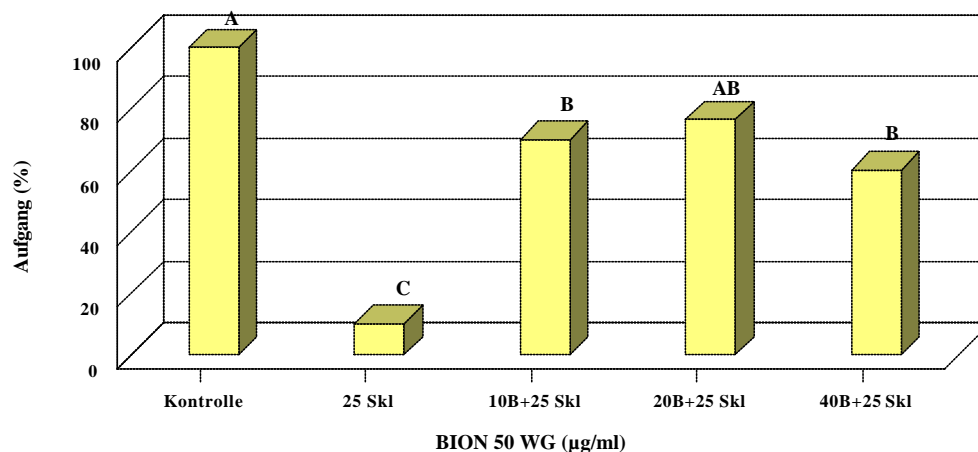
Der Befall der nur mit dem Erreger behandelten Linsenpflanzen war im Versuch, dessen Ergebnisse in Abb. 35c dargestellt sind, mit 85 % deutlich größer im Vergleich zu den mit dem Induktor behandelten Pflanzen, wobei die Anzahl der abgestorbenen Pflanzen 18 % bis 25 % erreichte. Wie bei den Versuchen mit anderen Pflanzen trat auch hier eine Zunahme der Mortalität der Pflanzen nach 20 Tagen auf. Bei der Behandlungen mit 5 µg/ml erreichte die Zahl der abgestorbenen Pflanzen 79 %, bei 10 µg/ml 43 % gegenüber 93 % der Pflanzen, die nur mit dem Pilz inokuliert worden waren. Im Verlauf des Versuches zeigten die Linsenpflanzen - wie die Pflanzen bei den anderen Experimenten auch - als Folge des Befalls des Pathogens eine sichtbare negative Auswirkung auf das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 35c:** Wirksamkeit der Induzierten Resistenz gegen *C. rolfii* an Linsen nach Samenbehandlung mit 5, 10 und 20 µg/ml BION® WG 50 bei 6 Stunden Behandlungszeit. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

### Blattbehandlung mit BION® WG 50 bei einer Inokulation von Samen mit Sklerotien von *C. rolf sii*

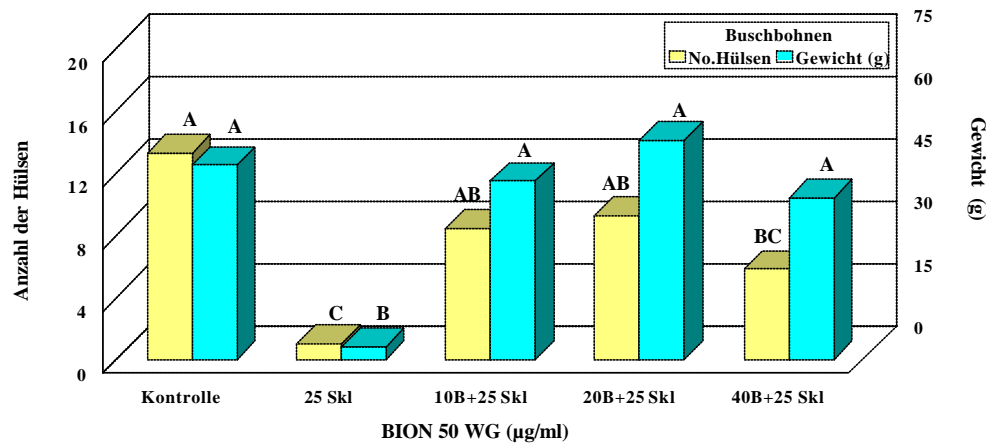
In diesem Experiment wurde das Saatgut der Buschbohnenpflanzen mit natürlichem Inokulum (Sklerotien) des Pathogens inokuliert. Die Samen eines Topfes wurden mit 25 Sklerotien von *C. rolf sii* zusammengebracht. Ein schneller Angriff durch *C. rolf sii* fand in keinem Fall statt, so daß die auflaufenden Keimlinge mit Konzentrationen von 10, 20 und 40 µg/ml BION® WG 50 besprüht wurden. Eine Aktivierung der Abwehrreaktion der Pflanzen gegen den Befall von *C. rolf sii* war erkennbar an der Anzahl der Pflanzen nach 20 Tagen, die sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle unterschied. Die Anwendung von 10 µg/ml BTH erreichte eine Wirksamkeit von 70%, 20 µg/ml 76%. Der Effekt der Induzierten Resistenz von BTH nahm ab, wenn die Konzentration weiter erhöht wurde (Abb. 36a). Die Fähigkeit der Samen, trotz des Kontaktes zwischen Saatgut und Sklerotien keimen zu können, ist wahrscheinlich nicht nur auf eine Verringerung der Keimfähigkeit der Sklerotien zurückzuführen, sondern auch auf eine niedrige Virulenz des Pathogens. Auf jeden Fall ist dieser Zustand des Erregers in den meisten Fällen zeitlich begrenzt. Wenn das Inokulum in einer bestimmten Menge und Infektionsstärke zur Verfügung steht, ist der Erreger fähig, die Pflanzen anzugreifen und sie abzutöten. Damit kann erklärt werden, warum die Pflanzen trotz des Vorhandenseins des Pathogens keimen konnten. Die Behandlung zur Induzierten Resistenz in den Pflanzen war wirksam und zeitlich koinzident.



**Abb 36a:** Wirksamkeit der Induzierten Resistenz an Buschbohnen nach Inokulation mit 25 Sklerotien von *C. rolf sii*. Aufgehende Pflanzen wurden mit BTH 10, 20 und 40 µg/ml besprüht. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

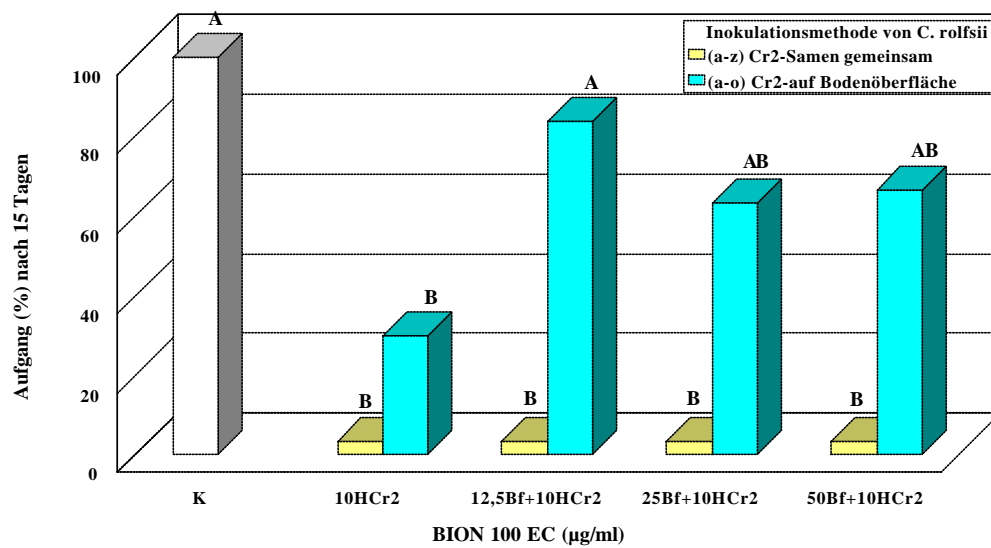
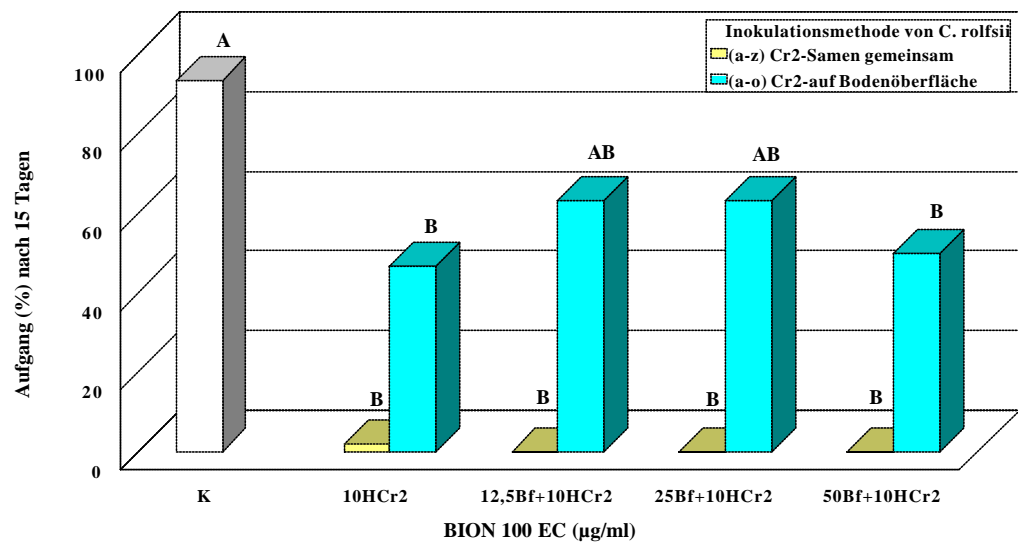
Um die Wirkung von BTH nach einer Inokulation mit Sklerotien mit der unbehandelten Kontrolle vergleichen zu können, wurde die Ernte anschließend ausgewertet. Die Anzahl der Hülsen bei der unbehandelten Kontrolle war signifikant verschieden von den mit BTH behandelten Pflanzen. Bei der Auswertung des Gewichts traten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den behandelten Pflanzen auf. Ein höheres Gewicht der Ernte wurde lediglich bei der Behandlung mit 20 µg/ml BTH beobachtet. Es wurde beobachtet, daß die Anzahl der Pflanzen in den verschiedenen Behandlungen im Vergleich mit der Kontrolle niedriger waren. Die Anzahl und das Gewicht der Hülsen der Pflanzen, die nur mit dem Pathogen behandelt wurden, war nicht repräsentativ im Vergleich zu anderen Varianten (Abb. 36b).





**Abb 36b:** Effekt der Induzierten Resistenz auf die Anzahl und das Gewicht (g) der Hülsen von Buschbohnen nach Inokulation mit 25 Sklerotien von *C. rolfii*. Aufgehende Pflanzen wurden mit BTH (10, 20 und 40 µg/ml) besprüht. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test ( $P=0.05$ ).

Eine Induktion der Abwehrmechanismen wurde mit der Anwendung von **BION® 100 EC** als Beizmittel getestet. Das Saatgut von Bohnen und Kichererbsen wurde mit Konzentrationen von 12,5, 25 und 50 µg/ml der Bion-Lösung in Mengen von 0,5 ml/100g Samen vier Stunden behandelt. Die Inokulation des Pathogens wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Bei der ersten Methode wurde das Inokulum mit den Samen zusammengebracht, bei der zweiten Methode wurde zuerst das Saatgut ausgesät und das Inokulum auf die Oberfläche gelegt und leicht mit Erde bedeckt. Die Ergebnisse beider Inokulationsmethoden zeigten einen großen Unterschied in bezug auf die Anzahl gekeimter und aufgegangener Pflanzen. Wurde der Erreger mit dem Samen zusammengebracht, entwickelten weder Bohnen noch Kichererbsen eine Induzierte Resistenz gegen *C. rolfii*. Das Saatgut sowie einige der aufgegangenen Pflanzen wurden vom Erreger innerhalb der ersten sieben Tage angegriffen. Die Anzahl der abgestorbenen Pflanzen erreichte 98% bei Bohnen (**Abb. 37a**) und bis zu 100% bei Kichererbsen (**Abb. 37b**). In den Versuchen mit vom Samen getrenntem Inokulum war die Induzierte Resistenz gegen *C. rolfii* in allen Fällen wirksam. Ein besonders signifikanter Befallsunterschied bei den Pflanzen, die mit verschiedenen Konzentrationen von BTH behandelt worden waren, war bei Bohnen und Kichererbsen zu erkennen. Die Befallsreduktion bei Bohnen erreichte bis zu 83% bei einer Konzentration von 12,5 µg/ml BHT und verringerte sich bis zu 66% in der 50 µg/ml BTH Behandlung. Bei Kichererbsen erreichte sie eine Wirksamkeit von 63% bei Verwendung von 12,5 µg/ml und 25 µg/ml BTH. Die Anwendung von BTH 50 µg/ml führte dagegen bei Kichererbsen zu einer Verringerung der Induzierten Resistenz und es traten teilweise phytotoxische Wirkungen, wie Wachstumshemmung und Chlorosen, auf.

**A Buschbohnen****B Kichererbsen**

**Abb. 37:** Wirksamkeit der Induzierten Resistenz gegen *C. rolfsii* an Buschbohnen und Kichererbsen nach Samenbehandlung mit 12,5-10, und 20 µg/ml BION® 100 EC bei 9h Behandlungszeit in Abhängigkeit von der Inokulationsmethode. Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test (P=0.05).

## 4 DISKUSSION

Verschiedene Arten von Bohnen sowie Linsen, Kichererbsen, Erbsen und Ackerbohnen sind wichtige Grundnahrungsmittel in Mittel- und Südamerika. Wegen ihres hohen Nährstoffgehaltes und den vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten werden sie in vielen Ländern vermehrt angebaut. Ihre Produktion wird durch phytopathogene Viren, Bakterien und Pilze sowie durch Insekten und Wildkräuter limitiert. Die teilweise sehr hohen Ertragsminderungen sind nicht nur ein wirtschaftliches Problem für die Landwirte, sondern gefährden auch die Nahrungsmittelversorgung der Bevölkerung.

Die meisten Pilzkrankheiten werden durch Pilze verursacht (KRANZ et al., 1982; PUNJA, 1985). Samen, Keimlinge, Blätter und Früchte sind im Feld und das Erntegut im Vorratslager ständig durch pilzliche Erreger bedroht. Von besonderer Bedeutung sind bodenbürtige Pilze wie *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* und *Corticium rolfsii*, die Sämlings- und Umfallkrankheiten an Keimlingen verursachen.

*C. rolfsii* greift weltweit verschiedene Kulturpflanzen an (AYCOCK, 1966; CIAT, 1981; BACKMAN & PORTER 1990; HALL und STEADMAN, 1991). Aufgrund seiner Lebensform als fakultativer Parasit kann dieser Pilz sowohl auf befallenem Wirtsgewebe als auch auf totem Substrat leben. Wegen seiner Fähigkeit, Sklerotien zu bilden, die im Boden mehrere Jahre überdauern können (SCHLÖSSER, 1997; PUNJA, 1988), ist der Erreger in der Praxis schwer zu bekämpfen.

Erhebliche Ertrags- und Qualitätsminderungen können in tropischen und subtropischen Gebieten meist nur durch Applikation von synthetischen Fungiziden verringert werden. Durch deren Anwendung kann zwar die Entwicklung von *C. rolfsii* und anderer phytopathogener Pilze gehemmt werden, gleichzeitig können aber auch Populationen nützlicher Pilze, wie z.B. Antagonisten, unterdrückt werden. Hierdurch kann das Auftreten anderer Krankheiten gefördert werden, die zuvor ohne wirtschaftliche Bedeutung waren (PAPAVIZAS, 1985). Eine zunehmende Selektion fungizid-resistenter Stämme pilzlicher Erreger hat zur Folge, daß bestimmte Fungizide in vielen Ländern nicht mehr genutzt werden können (JENKINS, 1985.).

Als Alternative wird seit geraumer Zeit die Möglichkeit einer biologischen Bekämpfung von Krankheitserregern mit verschiedenen Mikroorganismen weltweit geprüft (HENIS & PAPAVIZAS, 1983; LEWIS & PAPAVIZAS, 1984; GASONI et al., 1998; KOCH et al., 1998; MRINALINI & LATITHAKUMARI, 1998). Besonderes Interesse fanden *Trichoderma* spp. wegen ihres hohen antagonistischen Potentials zur biologischen Bekämpfung pilzlicher Krankheitserreger, besonders bodenbürtiger Pilze (CHET, 1987; SAMUELS, 1996).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, das antagonistische Potential von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfsii* zu ermitteln. Außerdem sollte geprüft werden, ob mit dem kommerziellen Induktor BION® (Benzothiadiazole, BTH) in verschiedenen Leguminosenarten eine Resistenz gegen *C. rolfsii* induziert werden kann. Eine Kombination von *Trichoderma* und BION® könnte eine Alternative zum Einsatz synthetischer Fungizide und damit wichtiger Bestandteil eines integrierten Krankheitsmanagements sein.

Für die Untersuchungen stand die umfangreiche Institutssammlung von *Trichoderma* spp. und – Stämmen zur Verfügung. Diese waren von KÖHL (1989) von verschiedenen Substraten aus Gebieten von Skandinavien bis zu den Pyrenäen isoliert worden. Aus diesem Material wurden einige Stämme der wichtigsten Arten ausgewählt. Von dem Pathogen *C. rolfsii* standen zwei Stämme zur Verfügung, die in Indien isoliert worden waren. Zunächst wurden

pathogene Pilze und die potentiellen Antagonisten hinsichtlich ihres Myzelwachstums, der Sporulation und Sklerotienbildung auf verschiedenen Agarmedien charakterisiert.

#### 4.1 Wachstum von *C. rolfii* auf verschiedenen Nährmedien

Das Wachstum von Pilzen wird neben anderen Faktoren vor allem durch das Vorhandensein von Nährstoffen bestimmt. Sowohl die Qualität als auch die Quantität der Nahrungsquelle begünstigen das Vorkommen und Überdauern sowie die Dichte der Erregerpopulation (KRANZ, 1996). Die Verwendung von PDA-, MPA- und PDYA-Nährmedien *in vitro* erwies sich für das Wachstum von *C. rolfii* und für die Produktion von Sklerotien als geeignet (Tab. 6.). Sein Wachstum liegt auf diesen Medien zwischen 20 und 21 mm/24h und kann sogar bis 30 mm/24h erreichen (PUNJA, 1982). Das GHA-Medium ist für das Wachstum des Pilzes jedoch nicht geeignet. Auf allen Medien bildete der Pilz eine große Anzahl von Sklerotien (Abb. 6). Die Bildung von Basidien und Basidiosporen findet unter Labor- und Feldbedingungen nur selten statt (AYCOCK, 1966; PUNJA, 1985; KULKARNI & AHMED, 1967, zitiert in PUNJA, 1988), auf Hirsekörnermedium können sich solche Strukturen jedoch nach ca. zwei Wochen bilden. Die Basidiosporen können bei 25 °C keimen und mittels Appressorien und Hyphen die Pflanze angreifen (PUNJA & GROGAN, 1983). Ihre optimale Entwicklung erfolgt bei Temperaturen zwischen 25 °C und 30 °C. Das führt dazu, daß das Auftreten des Pilzes auf warme Regionen beschränkt ist. In den meisten Fällen besitzt der Pilz ein weißes steriles Myzel und beginnt nach 6-7 Tagen - als Folge einer Minderung des Nahrungsangebots - mit der Bildung der Sklerotien. Solange der Pilz genügend Nahrung hat, bildet er keine Sklerotien. Dies wurde *in vitro* beobachtet, als das Pathogen auf Hirsekörnern kultiviert wurde, die reich an Kohlenhydraten und Proteinen sind (HOFFMANN et al., 1985). Nach vier Wochen Inkubationszeit zeigte *C. rolfii* noch immer keine Sklerotienbildung, sondern nur Myzel. Die Sklerotien sind die primäre Inokulumquelle des Pathogens. Ihre Zahl kann aber abhängig von den Nährmedien, Temperaturen, pH-Werten oder durch das Auftreten von Fungiziden oder anderen Organismen variieren. Ihre Keimung hängt stark von der Temperatur ab (PUNJA & GROGAN, 1984). PUNJA & JENKIS (1984) zeigten, daß für die Keimung der Sklerotien die optimale Temperatur bei 30 °C liegt und daß bei Temperaturen von 8 °C und 40 °C die Sklerotienkeimung gehemmt wird. In eigenen Versuchen fand eine Sklerotienkeimung bei 10 °C nicht statt (Daten nicht aufgeführt). Sie können unter 0 °C nicht überleben (PUNJA, 1988). In Gewächshausversuchen fanden SHEW et al. (1987), daß bei Temperaturen von 28 °C und hoher Luftfeuchtigkeit der Befall mit *C. rolfii* begünstigt wird. Bei solchen Bedingungen keimen die Sklerotien und bilden sehr schnell ein Myzel, das sich auf der Bodenoberfläche und auf den befallenen Pflanzen ausdehnt (KATAN, 1981).

#### 4.2 Wachstum von *Trichoderma* spp.

Es ist bekannt, daß Myzelwachstum und Sporulation von *Trichoderma* spp. durch Temperaturschwankungen und unterschiedliche Nahrungsangebote beeinflusst werden (PAPAVIZAS 1985; JIN et al., 1991). Die *Trichoderma*-Stämme *T. koningii* (T-165), *T. harzianum* (T-040), *T. hamatum* (T-093), *T. harzianum* (T-257) und *T. harzianum* (T-391) haben eine Wachstumsrate von +/- 25 mm/24h (Tab.7). Die Nährmedien PDA, PDYA und MPA sind für das Wachstum der Pilze geeignet. Die Kohlenhydratquellen und die Energie, die *Trichoderma* unter natürlichen Bedingungen für sein Wachstum benötigt, wurden im künstlichen Nährmedium durch Verbindungen von Mono- und Polysacchariden ersetzt. Andere Untersuchungen zeigen, daß Stickstoffverbindungen wie Ammonium, Nitrat, Aminosäuren (DANIELSON & DAVEY, 1973), oder anorganische Salze und Schwefel, sowie Vitamine für das Wachstum und die Pigmentation des Pilzes von Bedeutung sein können. Ihre genaue Rolle ist jedoch noch unklar (SHUKLA & MISHRA, 1970; GINDRAT, 1977).

*In vitro* variieren das Wachstum und die Sporulation, wenn das Medium gewechselt wird (Tab. 8). Die ideale Temperatur für ihr Wachstum unter Laborbedingungen liegt bei ca. 25 °C. Bei der Selektion von *Trichoderma* spp. muß neben anderen klimatischen Bedingungen besonders auf die Temperaturbedingungen geachtet werden, unter denen *Trichoderma* die Fähigkeit hat, sich zu entwickeln und aktiv zu werden. Temperaturschwankungen können das Verhalten von *Trichoderma* verändern. Ein Antagonismus von *T. koningii* (T-165), *T. harzianum* (T-040), *T. hamatum* (T-093), *T. harzianum* (T-257) und *T. harzianum* (T-391) fand bei 5 °C nicht statt, und ihr Wachstum war niedrig oder wurde gestoppt, was mit den Ergebnissen von KÖHL (1989) übereinstimmt.

Obwohl *Trichoderma* spp. weltweit verbreitet sind und auf verschiedenen Substraten vorkommen, sind einige Arten an bestimmte Klimazonen angepaßt. So fanden KÖHL & SCHLÖSSER (1988b), daß die *Trichoderma*-Arten *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* und *T. koningii* sich hinsichtlich ihrer Temperaturansprüche deutlich unterscheiden. DANIELSON & DAVEY (1973) berichten, daß sich *T. koningii*, *T. hamatum*, und *T. harzianum* in warmen Gebieten und *T. viride* und *T. polysporum* in kalten Zonen finden, während TRONSMO & DENNIS (1977) erwähnen, daß Isolate von *T. viride* und *T. polysporum* bei Temperaturen von 2 °C fähig sind zu wachsen und Temperaturen von 5 °C und 20 °C nicht oder ganz gering das antagonistische Potential von *Trichoderma* spp. beeinflussen. Inzwischen wiesen DUBOS (1992) und EDEN et al. (1996) nach, daß die Wirksamkeit von *Trichoderma* bei Temperaturen zwischen 15 und 25 °C optimal ist. Für eine Selektion von *Trichoderma*-Arten ist also neben ihrer Aggressivität auch ihre Toleranz von kühleren Temperaturen ein notwendiges Kriterium. KÖHL & SCHLÖSSER (1988b) fanden, daß kältetolerante Pilze, insbesondere *T. viride* und *T. hamatum*, für die praktische Anwendung bei der Bekämpfung bodenbürtiger Pilze von Bedeutung sein können. Flüssige Kulturen mit Hirse von *T. koningii* (T-165) und *T. harzianum* (T-040) wiesen die Fähigkeit auf, bei 5 °C ein Jahr lang zu überdauern, ohne ihr antagonistisches Potential zu verlieren. Sogar unter solchen Bedingungen waren *Trichoderma* spp. in der Lage, Biomasse und besonders Chlamydosporen zu produzieren, die eine wichtige Rolle in der biologischen Bekämpfung haben können (RIFAI, 1969; PAPAIVIZAS, 1985). Die Konidien und Chlamydosporen können längere Zeit schlechten Bedingungen widerstehen (POPPE et al., 1985). Entscheidend für ihre Fitness und Keimung ist die Nahrungsquelle (PAPAIVIZAS, 1985). Die Farbe sowie die Sporulation und in einigen Fällen die Wachstumsform stehen in engem Zusammenhang mit den Nährmedien. Die *Trichoderma*-Stämme T-165, T-040 und T-257 haben im allgemeinen eine grüne Farbe und erreichen den Höhepunkt der Sporulation nach 6-7 Tagen. Sie zeigen runde Formen oder alternativ Ringe, wahrscheinlich als Reaktion auf den Wechsel von Licht und Dunkelheit (PAPAIVIZAS, 1985). Die Konidienproduktion wird wahrscheinlich durch die Belichtung stimuliert (GRESSEL & HARTMANN, 1968). Die Pigmentation variiert von grün, gelb bis weiß. Die Stämme T-093 und T-391 sporulieren weiß. Die Pilze T-165 und T-040 produzieren bei der Sporulation zusätzlich eine große Anzahl von Chlamydosporen. *T. harzianum*, *T. viride* und *T. hamatum* können in flüssigen Medien, sterilisierten Böden oder in Bodenextrakten Chlamydosporen bilden (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1984).

### 4.3 Fungizidempfindlichkeit

In der Bekämpfung von Pathogenen und vor allem der besonders schwer bekämpfbaren bodenbürtigen Krankheitserreger ist *Trichoderma* spp. in zahlreichen Forschungen als ein natürliches Mittel erfolgreich entwickelt und eingesetzt worden (ELAD et al., 1981; MUKHERJEE et al., 1995; LEWIS et al., 1996; KHAN & GUPTA, 1998). Ihre Wirksamkeit wird aber in vielen Fällen unter anderem wegen ihrer Empfindlichkeit gegen Pflanzenschutzmittel reduziert.

Daher wurde die Empfindlichkeit des Pathogens und der ausgewählten *Trichoderma*-Stämme auf verschiedene synthetische Fungizide unter zwei Aspekten geprüft. Einmal sollten Fungizide identifiziert werden, die *C. rolfii* hemmen, die antagonistischen Pilze aber nicht oder nur geringfügig beeinflussen. Solche Fungizide könnten mit *Trichoderma* spp. kombiniert appliziert werden und die Wirkung des Antagonisten unterstützend stabilisieren. Von den geprüften Fungiziden zeigte nur Triadimenol eine Tendenz zur gewünschten Wirkung. Das Wachstum von *C. rolfii* im Agarschalentest wurde durch 25-100 µg/ml vollkommen unterdrückt, während die *Trichoderma* spp. nur mit einer leichten Hemmung reagierten. Insgesamt ist die Chance, einen fungiziden Wirkstoff zu finden, der für die gewünschte Diskriminierung unter Praxisbedingungen geeignet wäre, als gering anzusehen.

Ein weitere Nutzung von Fungiziden betrifft die Auswertung von Dualkulturen, in denen der Antagonist das Pathogen überwachsen hat, bzw. *Trichoderma*-bewachsene Sklerotien von *C. rolfii*. Um beurteilen zu können, ob der phytopathogene Pilz unter dem Einfluß des Antagonisten abgestorben ist, muß ein Fungizid zur Verfügung stehen, das den Antagonisten sicher eliminiert und so ein ungehindertes Wachstum von *C. rolfii* ermöglicht. Für diese diskriminierende Wirkung erwies sich nur Benomyl als geeignet. Konzentrationen von 5 – 10 µg/ml Benomyl führten im Agarschalentest zu einer vollständigen Hemmung des Myzelwachstums aller *Trichoderma* spp., während *C. rolfii* selbst durch 100 µg/ml Benomyl nicht beeinflußt wurde. Benomyl ist danach für die vorgesehene Art der Auswertung geeignet. Unter den untersuchten Materialien erwies sich T-391, ein Isolat von *T. harzianum* aus einem Ackerboden bei Giessen, als hochgradig resistent gegen Benomyl und wurde selbst durch 50 µg/ml in seinem Myzelwachstum nicht sichtbar beeinflußt.

In Kombination mit Benomyl wäre ein solcher Stamm für eine integrierte Bekämpfung geeignet. Eine Voraussetzung wäre, daß der zu bekämpfende pilzliche Erreger auf Benomyl empfindlich reagiert. Dies ist bei *C. rolfii* jedoch nicht der Fall.

#### 4.4 Antagonismus von *Trichoderma* gegen *C. rolfii*

Die antagonistischen Eigenschaften von *Trichoderma*, d.h. die Fähigkeit des Pilzes, das Wachstum eines Erregers zu unterdrücken und ihn abzutöten, wird noch in vielen Untersuchungen diskutiert (LIU & BAKER, 1980; AHMAD & BAKER 1987a,b; FRAVEL, 1988; LEWIS & PAPAVIDAS, 1987b; LORITO et al., 1993). An der Interaktion Antagonist - Pathogen sind eine Reihe von Faktoren beteiligt. So zeigte sich, daß die potentielle Antagonismusfähigkeit von *Trichoderma* immer dann nicht mehr wirksam ist, wenn einige der wesentlichen Bedingungen wie Nahrungsangebot und Temperatur nicht erfüllt sind. Während des Wachstums scheidet der Antagonist toxische, volatile und nicht volatile Substanzen aus, die das Wachstum anderer Pilze verzögern oder hemmen können. Die Produktion solcher Stoffwechselprodukte mit einer antibiotischen Wirkung wurde durch WEINDLING (1934) erstmals festgestellt. Seitdem sind *Trichoderma* spp. als eine Möglichkeit zur biologischen Bekämpfung zahlreicher phytopathogener Pilze intensiv untersucht worden (COOK & BAKER, 1983; JONES & HANCOCK, 1988; NELSON & POWELSON, 1988; GHISALBERTI & ROWLAND, 1993).

Dabei wird die Bildung von Hemmstoffen als einer der wichtigsten Mechanismen des antagonistischen Potentials von *Trichoderma* gesehen, die zusammen mit der Enzymproduktion während des Parasitismus und der Konkurrenzfähigkeit um Nahrung und Raum die Unterdrückung des Wachstums von Erregern zur Folge hat (PACHENARI & DIX, 1980; ELAD et al., 1983; PAPAVIDAS, 1985; WOLF et al., 1986). Volatile Stoffe von *Trichoderma* spp. konnten in Dualkulturen das Wachstum von *C. rolfii* sehr stark hemmen, ihn aber nicht gänzlich abtöten. Aufgrund seines breiten Spektrums waren *Trichoderma* spp. auch gegen andere bodenbürtige Pilze wie *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. und *Fusarium*

spp. wirksam. Die Wirksamkeit von *Trichoderma* spp. auf das Myzelwachstum zahlreicher Pilze durch das Ausscheiden von antifungalen Substanzen konnte bereits durch DENNIS & WEBSTER (1971a,b) nachgewiesen werden.

Die Produktion solcher Substanzen in bestimmten Mengen ist abhängig von der Inkubationszeit der *Trichoderma*-Stämme und der Nährmedien (TOKIMOTO, 1986 bei KÖHL, 1989). Auf PDA und PDYA hatten die Metaboliten eine höhere Wirkung gegen *C. rolfii* als auf MPA (Tab. 18, Tab. 19). Auf GHA-Medium war ihre Aktivität deutlich geringer.

Innerhalb der einzelnen *Trichoderma*-Arten und - Isolate variiert ihre Eigenschaft zur Bildung von Toxinen sowie die Ausprägung des Antagonismus (MIHUTA-GRIMM & ROWE, 1986). *T. koningii* (T-165) und *T. harzianum* (T-040) sind wirksamer als *T. harzianum* (T-257), *T. harzianum* (T-391) und *T. hamatum* (T-093). Bei der Produktion der toxischen Substanzen ist die Inkubationszeit der Pilze auf dem Medium von großer Bedeutung. Die *Trichoderma*-Stämme *T. harzianum* (T-040), *T. harzianum* (T-126), , *T. viride* (T-192), *T. viride* (T-226), *Trichoderma* spp. (T-12j), *T. viride* (T-190) und *T. hamatum* (T-047) produzieren nach ca. 10-12 Tagen genügend volatile Stoffe, um eine deutliche Hemmung des Wachstums von *C. rolfii* zu verursachen. Eine Selektion von *Trichoderma* spp. mit potentiellm Antagonismus aufgrund ihrer Produktion von Hemmstoffen kann hilfreich sein, jedoch nicht in jedem Fall. Einige *Trichoderma*-Pilze (z.B. *T. harzianum* T-257) können das Wachstum des Pathogens mittels der Bildung flüchtiger Stoffe hemmen, waren aber beim Parasitismus in Dualkultur nicht effektiv.

Beim Parasitismus von *Trichoderma* gegen *C. rolfii* und andere pilzliche Erreger sind Produktion und Aktivität verschiedener hydrolytischer Enzyme zum Abbau der Zellwände von großer Bedeutung (HARMAN et al., 1980; BARAK et al., 1984; LEWIS & PAPAVIDAS 1987b; SIVAN & CHET, 1989; LORITO et al., 1993; CHET et al., 1998). Innerhalb von 3-4 Tagen nach dem Zusammentreffen konnten *Trichoderma* spp. den Erreger überwachsen und abtöten. Die für diesen Prozess verantwortlichen Mechanismen sind die Bildung und Beteiligung lytischer Enzyme, wie  $\beta$ -1,3-Glucanasen und Chitinasen, durch die der Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* verstärkt wird (BARAK et al., 1984b; LORITO et al., 1993). Die Zellwände von *C. rolfii* werden außer von  $\beta$ -1,3-Glucanasen und Chitinasen auch von Cellulasen, Proteasen und Lipasen abgebaut (CHERIF & BENHAMOU, 1990; HARMAN et al., 1993; CHET et al., 1998).

Neben der Rolle der Enzyme sind bei der Parasitierung von *C. rolfii* auch die Bildung verschiedener Strukturen wie Appressorien sowie die Eigenschaft der Hyphen von *Trichoderma*, andere zu umwinden und zu penetrieren, wichtig (Abb. 15 C, F, G) (PERSSON et al., 1985). Solche Merkmale sind bei der Parasitierung von *R. solani* durch *Trichoderma* beobachtet worden (BEDLAN, 1988). Die Appressorien von *Trichoderma* haften fest an den Hyphen des Pathogens und bauen mittels Enzymen die Zellwand ab (ELAD et al., 1983). Die Erkennung der Hyphen von *C. rolfii* kann auf eine chemotrophische Aktivität ausgeschiedener Substanzen an der Oberfläche der Wirtszellwand, wie Lectine, zurückgeführt werden (INBAR & CHET, 1997). Mittels Elektronenmikroskop konnte beobachtet werden, daß beim Mikroparasitismus durch *Trichoderma* eine Verdauung von Zellinhaltsstoffen des Wirtes stattfindet (Abb. 15 H). Dieser Prozeß läuft durch die Freisetzung toxischer Substanzen und durch die Ausscheidung membranlysierender Enzyme wie Phospholipasen, Proteasen und Lipasen ab (WOLF et al., 1986; LEWIS & PAPAVIDAS, 1987). Bei der Parasitierung und dem Abbau der Sklerotien von *C. rolfii* konnte eine Beteiligung der Enzyme  $\beta$ -1,3 Glucanase und Chitinase nachgewiesen werden (ELAD et al., 1984). Für den Abbau der Zellwände der Hyphen und der Sklerotien ist ein Kontakt zwischen dem Antagonisten und dem Pathogen nicht notwendig (PACHENARI & DIX, 1980) Die Fähigkeit von *Trichoderma*, die Zellwände der Hyphen und die Sklerotien von *C. rolfii* abzubauen, ist auch gegen andere Pathogene

erfolgreich *in vitro* getestet und in der Praxis eingesetzt worden (TU, 1980; HARMAN et al. 1980).

Der Erfolg von *Trichoderma* als Mittel zur biologischen Bekämpfung hängt von seiner Fähigkeit ab, unter natürlichen Bedingungen den Boden oder das Substrat zu besiedeln. Während der Interaktion Antagonist - Pathogen produzieren *Trichoderma* spp. eine große Anzahl von Konidien und Phialiden, die bei der Konkurrenz um Nahrung und Platz eine wichtige Rolle spielen (CHET et al., 1983; MANZALI et al., 1993). Beim Antagonismustest in Dualkulturen konnten einige Stämme von *Trichoderma* spp. unmittelbar nach dem Zusammentreffen den Pathogen überwachsen und sporulieren. Wie bereits erwähnt, können Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit sowie physikalische und chemische Eigenschaften des Bodens sowie Fungizide das Inokulum von *Trichoderma* nach seiner Einführung im Boden stark verringern oder zu einer eingeschränkten Antagonismusaussprägung führen (PAPAVIZAS, 1985, bei HERMOSA et al., 1986). Die Unterdrückung des Wachstums des Pathogens wegen Nahrungs- und Platzkonkurrenz wird auch durch das Verhältnis zwischen der Inokulumkonzentration von *Trichoderma* spp. und dem Erreger bestimmt. Daß die Antagonismusmechanismen von *Trichoderma* spp. mit dem Ernährungszustand des Pilzes korrelieren, konnte auch hier *in vitro* bestätigt werden.

Die Wahl des richtigen Mediums entscheidet über die Ausprägung des Antagonismus. Auf PDA und PDYA - Medium zeigten die geprüften *Trichoderma*-Stämme eine höhere Wirksamkeit gegen *C. rolfii* als auf MPA und GHA - Medium. Der Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* konnte mit Hilfe eines Selektivmediums nachgewiesen werden (Tab. 13).

#### 4.4.1 Parasitierung von Sklerotien

Es konnte nachgewiesen werden, daß *Trichoderma*-Stämme im allgemeinen einen hohen Wirkungsgrad gegen eine Reihe von Pathogenen haben. Dieses Potential muß nicht nur hinsichtlich der Parasitierung von Hyphen oder einer Wachstumshemmung von *C. rolfii* und anderen Pathogenen bewertet werden. Wie eingangs erwähnt, sind die Sklerotien zahlreicher Erreger eine wichtige und potentielle Inokulumquelle für das Auftreten und die Verbreitung der Pilze. *Trichoderma* sollten daher fähig sein, diese zu besiedeln und abzubauen. Hier zeigte sich, daß eine Besiedlung der Sklerotien mit intensiver Sporulation durch *Trichoderma* spp. nicht immer zur Mazeration der Sklerotien führt. Ihre Effektivität, die Sklerotien zu besiedeln und abzubauen, unterscheidet sich je nach Stamm und Art. Beim Abbau der Sklerotien von *C. rolfii* spielt hier wieder die Produktion der Enzyme Chitinase und Glucanase eine wichtige Rolle (ELAD et al., 1984). In mehreren Untersuchungen wurden *Trichoderma* spp. zum Abbau von Sklerotien unterschiedlicher Pathogene getestet. *T. viride* und *T. koningii* waren wirksamer als *T. harzianum* und *T. hamatum* gegen Sklerotien von *B. cinerea* (KÖHL & SCHLÖSSER, 1989b), *T. harzianum* baute die Sklerotien von *C. rolfii* ab (HENIS & PAPAVIZAS, 1983), zum Abbau von Sklerotien von *Sclerotinia sclerotiorum* war *T. harzianum* sehr effektiv (KNUDSEN & ESCHEN, 1991). Die besiedelten, aber nicht mazerierten Sklerotien konnten nicht keimen, was auf die Wirkung von ausgeschiedenen Toxinen zurückgeführt werden kann. Die Fähigkeit von *Trichoderma*, auch bei niedrigen Temperaturen Sklerotien abzubauen, wurde mittels *Trichoderma* spp. gegen Sklerotien von *B. cinerea* bei 5 – 10 °C nachgewiesen (KÖHL & SCHLÖSSER, 1989b). Beim Abbau der Hirsekörner - Inokulumträger von *C. rolfii* (HCr<sub>2</sub>) zeigten *Trichoderma* spp. eine höhere Wirksamkeit. Die vorhandenen Nährstoffe in den Hirsekörnern konnten die Besiedlung durch den Antagonisten stimulieren. Unabhängig von Art und Stamm war das antagonistische Potential von *Trichoderma* und deren Fähigkeit, die Träger abzubauen, sehr effektiv. Die Antagonismusfähigkeit von *Trichoderma* spp. muß nicht nur auf der Wachstumshemmung



oder Parasitierung der Hyphen des Pilzes basieren, sondern kann auch auf die Fähigkeit, die Keimung der Sklerotien zu verhindern oder sie abzubauen, zurückgeführt werden, was zur Verringerung der Inokulumkonzentration des Pathogens im Boden führen kann.

Zahlreiche Krankheitserreger, wie *Botrytis cinerea* oder einige bodenbürtige Pilze wie *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* oder *Corticium rolfsii*, bilden Sklerotien, deren Strukturen ähnlich wie die Dauersporen von *Pythium* und Chlamydosporen bei *Fusarium* für das Auftreten von Krankheiten das Primärinokulum des Pathogens sind (PUNJA & GROGAN, 1984). Diese phytopathogenen Erreger haben einen großen Wirtspflanzenkreis. Das Vorhandensein der Wirte als Inokulumquelle sichert neue Infektionen, und die Bildung resistenter Strukturen sichert das Überleben des Pathogens, wenn die Bedingungen für neue Infektionen und für die Krankheitsentwicklung nicht optimal sind.

Die Zahl der vorhandenen infektiösen Einheiten im Boden, die oft als Inokulumkonzentration bezeichnet wird, ist beim Infektionsprozeß entscheidend. Sie kann je nach Wirtstyp variieren. In den Versuchen konnte festgestellt werden, daß eine steigende Zahl von 5 bis zu 100 Sklerotien als Inokulum von *C. rolfsii* nicht immer zu einer höheren Mortalität der Pflanzen führte. Über die notwendige Zahl der Sklerotien, um die Krankheit zu verursachen, ist bisher kontrovers diskutiert worden. In unterschiedlichen Untersuchungen führte das Vorhandensein von 2 bis 4 Sklerotien in Kontakt mit den Samen (TOMASINO, 1987); 5 bis 10 Sklerotien/cm<sup>3</sup> (PUNJA, 1988); und Mengen von 5 bis 10 Sklerotien/1.000g Boden zu einer 100%igen Mortalität der Pflanzen.

Die Bodenbedingungen spielen für die Infektion des Pathogens ebenfalls eine große Rolle (AYCOCK, 1966; SHEW et al., 1984; TOMASINO, 1987). Während der Keimung der Sklerotien ist der Pilz sehr anfällig gegen biotische (Antagonisten) und abiotische Faktoren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) (SCHLÖSSER, 1997). Je nach Aktivität und Einfluß können sie die Krankheitsinfektion auslösen oder verhindern (KRANZ, 1996). Bei einer Inokulation von Pflanzen mit *C. rolfsii* in verschiedenen Inokulumkonzentrationen konnte gezeigt werden, daß Isolate von verschiedenen Feldern, Wirten und geographischen Gebieten in ihrer Aggressivität erheblich variieren (PUNJA & MORGAN, 1983b).

Die Distanz zum Wirt sowie die Tiefe des Inokulums im Boden können die Infektion der Pflanzen negativ oder positiv beeinflussen. Ein direkter Kontakt von Sklerotien mit den Samen ist optimal für das Auftreten der Krankheit. In Versuchen mit Hirsekörnern als Inokulum von *C. rolfsii* stellte der Kontakt zwischen Inokulum und Samen den entscheidenden Faktor bei der Pflanzeninfektion dar. Frisches und sechs Monate altes Inokulum des Pathogens verursachten 100% Mortalität der Buschbohnen- und Kichererbsenpflanzen, als sie mit den Samen in Kontakt gebracht wurden. Die Infektion der Pflanzen durch das Pathogen nahm deutlich ab, als das Inokulum nicht in Samennähe, sondern auf dem Boden ausgebracht wurde. TOMASINO (1987) fand, daß eine Distanz von 3 cm zwischen Pathogen und Samen sowie eine Tiefe von 0,5 cm die Inzidenz der Krankheit im Vergleich zu anderen Untersuchungen, bei denen das Inokulum und die Samen in Kontakt waren, verringerte. Gleichmaßen konnten PUNYA & JENKIS (1984) zeigen, daß sich die Keimung der Sklerotien in Tiefen von 2,5 cm verringerte und über 7 cm gehemmt wurde. Danach erscheint es somit möglich, daß die Inokulumtiefe für die Keimung der Sklerotien und Infektion der Pflanzen der wichtigste Faktor ist.

Umweltbedingungen wie Temperatur und Feuchtigkeit sind entscheidende Faktoren, die für die Keimung der Sklerotien, das Wachstum von *C. rolfsii* sowie für die Pflanzeninfektion eine große Rolle spielen und gesteuert werden können. In den einzelnen Phasen der Infektion durch den Pathogen gibt es minimale, optimale und maximale Temperaturen (KRANZ, 1996). Für die Krankheitsentwicklung von *C. rolfsii* sind unter Gewächshausbedingungen Temperaturen von mindestens 20°C und maximal 30 °C notwendig. PUNJA & JENKIS (1984)

fanden für die Keimung der Sklerotien eine optimale Temperatur von 30 °C, wohingegen ihr Wachstum bei 40 °C gehemmt wird. SHEW et al. (1987) erwähnen, daß bei Temperaturen von 28 °C und hoher Luftfeuchtigkeit der Befall durch *C. rolfii* im Gewächshaus begünstigt wird. Bei dieser Untersuchung wurden die Keimfähigkeit der Sklerotien und das Wachstum von *C. rolfii* bei Temperaturen von ca. 25 °C gefördert.

Außer der Temperatur können andere Faktoren die Keimfähigkeit der Sklerotien und den Pilzbefall beeinflussen. So können ausgeschiedene volatile Substanzen von Pflanzen, wie Alkohole und Acetaldehyde, die Keimung der Sklerotien induzieren. PUNJA et al. (1984) berichten, daß die Keimfähigkeit durch die Aktion der Mikroflora und der Antagonisten in der Rhizosphäre verringert wird. SHEW et al. (1987) fanden, daß die Keimung der Sklerotien auf nicht sterilisiertem Boden niedriger war als auf sterilisiertem Boden, was auf die Wirkung von Antagonisten in der Rhizosphäre zurückgeführt werden kann. Vom Nahrungsangebot, das dem Pilz zur Verfügung steht, hängt die Aggressivitätsausprägung des Erregers ab (KATAN, 1981). Dies kann erklären, warum für die Pflanzeninfektion die Hirsekörner als Inokulumträger wirksamer waren als die Sklerotien. Hirsekörner sind während der Keimung eine entscheidende Nahrungsquelle für das Pathogen. Außerdem ist die Keimungszeit von *C. rolfii* bei Hirsekörnern deutlich kürzer als die der Sklerotien.

#### 4.5 Gewächshausversuche

Bei der Bekämpfung von *C. rolfii* und anderen bodenbürtigen Pilze bietet die Anwendung von *Trichoderma* spp. zwar eine Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln. Deren antagonistische Wirksamkeit kann aber – wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt – durch die Formulierung, die verwendete Applikationsmethode, den allgemeinen Nährzustand des Pilzes, den Inokulumträger sowie die Wirtspflanze, die der Pilz schützen soll, beeinträchtigt werden.

Aus diesem Grund wurde im weiteren Versuchsablauf untersucht, ob für Kulturen von *Trichoderma* spp. durch Variation der zuvor genannten Faktoren ein geeignetes Applikationsverfahren gegen *C. rolfii* gefunden werden kann. Nach der erfolgreichen künstlichen Inokulation des Erregers *C. rolfii* mit Hirsekörnern wurden diese nun ebenfalls als Inokulumträger von *Trichoderma* spp. bei Buschbohnen- und Kichererbsenpflanzen verwendet. Nach zehn Tagen Inkubation von *Trichoderma* auf Hirsekörnern ist der Pilz in der Lage, diese intensiv zu besiedeln. Auf diese Weise dienen die Hirsekörner als Träger und Nahrungsquelle für *Trichoderma*, so daß der Pilz nach der Einführung im Boden lebendig und aktiv bleibt und möglicherweise die Besiedlung der Träger durch andere Organismen verdrängt. Ist der Antagonist mittels Konidiensuspensionen an den Träger inokuliert und würde kurz danach in den Boden eingeführt, ohne daß er sich vor der Applikation im Träger hätte stabilisieren können, wäre der Träger durch andere Organismen, z.B. Bakterien, besiedelt und zerstört worden. Das Potential von *Trichoderma* zur biologischen Pathogenbekämpfung variiert mit der Nahrungsversorgung. Das heißt, die unterschiedlichen Gehalte verschiedener Substrate an organischer Substanz beeinflusst die Aktivität des Pilzes (DANIELSON & DAVEY, 1973) und der Pflanzen positiv oder negativ (BAKER, 1989; HARMAN & BJORKMAN, 1998).

##### 4.5.1 Hirsekörner als Inokulumträger von *Trichoderma*

Mit *T. harzianum* (T-040) besiedelte Hirsekörner wurden in unterschiedlichen Mengen und zusammen mit den Samen der Pflanzen in den Boden gelegt. Die Keimfähigkeit sowie das Wachstum der Buschbohnen- und Kichererbsenpflanzen wurden deutlich gefördert und zwar gleichermaßen bei einer geringen und bei einer höheren Inokulumkonzentration (Abb. 16a;

**16b).** Zur Saatgutbeizung wurde die Biomasse von *Trichoderma* spp. aus verschiedenen Nahrungsquellen (Hirsekörner und PDA-Medium) gewonnen und die Konidien auf unterschiedliche Konzentrationen eingestellt. Mittels Alginatlösungen wurde die Biomasse des Antagonisten auf die Samen aufgetragen (**Abb. 26a; 26b**).

Wie beim Hirsekörner - Inokulumträger von *Trichoderma* hatte der Antagonist mit Alginat keine negative Wirkung auf den Aufgang der Pflanzen. Das Wachstum der Pflanzen war ebenfalls besser als das der unbehandelten Kontrolle. Für die Zunahme des Pflanzenwachstums nach Einführung von *Trichoderma* spp. im Boden wurden verschiedene Erklärungen gefunden. Vermutlich ist sie auf ein Eindringen des Antagonisten in das Wurzelsystem zurückzuführen, wo er wie ein Endo-Mykorrhizapilz auf die Wirtspflanze wirkt (KLEIFELD & CHET, 1992). In einigen wichtigen weltwirtschaftlichen Kulturen wurden erhebliche Wachstums- und Ertragssteigerungen erzielt, nachdem sie mit einer vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza (**VAM**) beimpft wurden (CHANG et al., 1986; WERNA, 1987). Vesikulär-arbuskuläre Pilze haben die Fähigkeit, in die Wurzeln einzudringen, diese zu besiedeln und das Wachstum der Pflanzen zu fördern, was zu Veränderungen im Stoffwechsel der Wurzeln führt (SPANU et al., 1988). Solche Eigenschaften sind auch in Pflanzen beobachtet worden, die mit *Trichoderma* inokuliert worden waren (YEDIDIA et al., 1999). Die Unterdrückung des Wachstums sekundärer Pathogene durch *Trichoderma* in der Rhizosphäre der Pflanzen kann aber auch eine bessere Mineralstoffgewinnung, eine Freisetzung von Nährstoffen und organischem Material aus dem Boden sowie eine Produktion von Pflanzenhormonen, die das Pflanzenwachstum verbessern können, bewirken (WERNA, 1987; JACKSON, 1997; MBAR et al., 1994; BEYRLER, 1995; ALTOMARE et al., 1999). Die Fähigkeit von *Trichoderma*, in den Pflanzen eine Induzierte Resistenz gegen Pathogene zu erzeugen, ist nicht ausgeschlossen (YEDIDIA et al., 1999).

Ob wichtige Elemente, wie z.B. Phosphor, den Pflanzen nach Inokulation des Bodens durch eine Mykorrhiza zur Verfügung stehen (WERNA, 1987), ist nach Inokulation von *Trichoderma* noch unklar. Einige Mikronährstoffe, wie Eisen  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ , Mangan Mn (III-IV) zu Mn(II), und  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$ , können durch die Aktivität von *Trichoderma* in der Rhizosphäre reduziert werden (ALTOMARE et al., 1999) und für die Pflanzen freigesetzt werden (MENGEL, 1991). Die Verfügbarkeit solcher Nährstoffe ist für das Wachstum, die Entwicklung und die Resistenz der Pflanzen von besonderer Bedeutung. Durch die Inokulation der Antagonisten *T. harzianum* und *Aspergillus niger* und des Mykorrhizapilzes *Beijerinckia mobilis* bei Mais, Gerste, Weizen, Hafer, und *Sorghum* konnte gleichzeitig eine biologische Bekämpfung von Wurzelkrankheiten durch *Trichoderma*, eine erhöhte Nährstoffaufnahme und Verfügbarkeit von Phosphat durch *A. niger* und eine verbesserte Stickstofffixierung durch *B. mobilis* erreicht werden. Die Beziehungen und Wechselwirkungen innerhalb der Rhizosphäre von Kulturpflanzen hinsichtlich der Kombination der verwendeten Inokulumtypen sind jedoch sehr spezifisch (DHILLON, 1993). Auch KÖHL & SCHLÖSSER (1989c) erwähnen, daß mittels eines kombinierten Präparats von VAM-Pilzen und *Trichoderma* spp. das Pflanzenwachstum gefördert werden kann. *Trichoderma* hat keine Wirkung gegen Mykorrhiza, kann aber je nach Art der Kulturpflanze und den im Boden eingeführten Organismen in seiner Wirksamkeit variieren (DHILLION, 1993). Das antagonistische Potential von *Trichoderma* und die Aktivität der Mykorrhiza kann durch den pH - Wert, die Temperatur, den Bodentyp oder das Auftreten von Pflanzenschutzmitteln in der Rhizosphäre negativ beeinflusst werden (JALEED & BAKER, 1986; WERNA, 1987). An organischen Substanzen reiche Böden können das Überleben von *Trichoderma* und von VAM-Pilzen fördern (TAYLOR et al., 1991). Die synergetische positive Wirkung zwischen beiden Pilzen verspricht in Zukunft kombinierte Biopräparate, mit denen einerseits eine biologische Bekämpfung von bodenbürtigen Pilzen durch *Trichoderma* durchgeführt werden kann und gleichzeitig durch die Aktivität der Mykorrhiza in der Rhizosphäre die Entwicklung der Pflanzen gefördert wird.

#### 4.5.2 Bodeneigenschaften

Die Bodeneigenschaften wie Bodenart, Textur sowie die Nährstoffversorgung können nicht nur auf die Wirtspflanzen, sondern auch auf die Pathogene wirken. Diese Faktoren beeinflussen das Wurzelwachstum und damit die Entwicklung und Disposition der Pflanzen. Von ihnen hängen auch die Verteilung, die Überlebensfähigkeit, die Mobilität und die Krankheitseffizienz der bodenbürtigen Erreger ab (KRANZ, 1996). Das Auftreten verschiedener Bodenorganismen, die unterschiedliche antagonistische Wirkung besitzen, kann das Überdauern des Inokulums eines Erregers im Boden beeinflussen. Sie können Fungistasis (HO & KO, 1985) und suppressive Böden (HUBER & SCHNEIDER, 1982; COOK & BAKE, 1983; HORNBY, 1983) hervorrufen und bei Nährstoffmangel oder hoher Inokulumkonzentration eine Selbstinhibition der Sklerotienkeimung auslösen.

Obwohl in mehreren Untersuchungen von einer suppressiven Wirkung von Komposterde auf das Wachstum von Erreger und Antagonist berichtet wird, finden sich *Trichoderma* spp. als Hauptbesiedler von kompostierten Rinden (NELSON et al., 1983). In solchen Substraten ist eine suppressive Wirkung gegen pilzliche Erreger beobachtet worden, die auch auf das Auftreten von *Trichoderma* und ihre antagonistische Aktivität zurückgeführt werden kann (HOWIE et al., 1987). Die suppressive Wirkung von Komposterde kann durch Autoklavieren verringert, aber nicht verhindert werden (COOK & ROVIRA, 1976; BAKER & CHET, 1982). Während der Durchführung der Versuche zeigte sich, daß Komposterde ein günstiges Substrat nicht nur für das Wachstum von *Trichoderma*, sondern auch für *C. rolfii* ist, wenn das Inokulum beider Pilze mit ausreichenden Nährstoffen im Boden eingeführt wird. Eine Applikation von *Trichoderma* mit ausreichenden Nährstoffen kann einerseits zu einer schnellen Besiedlung des Substrates führen und das Wachstum von *C. rolfii* verzögern, andererseits kann der Pilz durch seine Aktivität in der Rhizosphäre auf das Pflanzenwachstum positiv einwirken. Eine suppressive Wirkung von Komposterde gegen Hirsekörner als Inokulumträger von *C. rolfii* oder *Trichoderma* spp. oder durch Zersetzungsprodukte der Substrate wurde in den Versuchen nicht beobachtet. Jedoch fand in den Versuchen mit Sklerotien keine Keimung statt. Ob die Hemmung der Sklerotienkeimung auf einen antagonistischen Effekt der Fungistasis oder auf eine Suppressivität des Bodens zurückzuführen ist, wie in anderen Untersuchungen berichtet wird (CURL & HANDSEN, 1964; NELSON et al., 1983), ist noch unklar. Die Sporenkeimung im Boden steht in engem Zusammenhang mit dem Überleben des Pilzes, der durch Fungistasis in eine Latenzzeit treten kann (LOCKWOOD, 1977; PAPAVIDAS & LUMSDEN, 1980), die bei vielen Pilzen ein natürlicher Schutzmechanismus ist. Sporen und Chlamydosporen, die in einen fungistatischen Boden eingeführt worden sind, können für längere Zeit überleben. Durch das Vorhandensein von Energiequellen und organischen Substanzen im Boden kann der fungistatische Effekt jedoch unwirksam werden (LOCKWOOD, 1977). Zwar wird die antagonistische Aktivität von *Trichoderma* in der Bekämpfung phytopathogener Pilze hiervon nicht betroffen, aber organische Verbindungen, Kohlenstoff, Stickstoff, Mono-, Di- und Polysaccharide sowie vorhandene Eisenchelate können eine Zunahme der Population von *Trichoderma* spp. im Boden verhindern (PAPAVIDAS, nicht publiziert).

Durch die Ausscheidung von Wurzelexsudaten kommt es im wurzelnahen Bereich zu einer Anreicherung der Mikroorganismenaktivität, die auch für *Trichoderma* von Bedeutung sein kann. In der Interaktion Pilz - Pflanze ist der wurzelnaher pH-Wert für die Aktivität des Antagonisten, aber auch für andere Organismen, ein wichtiger Faktor. Der pH-Wert wird durch die Wurzelexsudation, durch die Nährstoffaufnahme in der Pflanzenwurzel und die damit verbundenen Transportprozesse sowie durch  $H^+$  - Ausscheidungen in Zusammenhang mit dem Wurzelwachstum bestimmt. Die Erhöhung des pH-Wertes innerhalb der Rhizosphäre wird durch die Abscheidung von  $HCO_3^-$  durch die Pflanzenwurzel verursacht. Eine

hemmende Wirkung hoher pH-Werte auf *C. rolfii* wurde beschrieben (DANIELSON & DAVEY, 1973; JENKIS & AVERRE, 1986), obwohl *C. rolfii* und *Trichoderma* spp. *in vitro* sowohl bei niedrigen als auch bei höheren pH-Werten gut wachsen konnten (Daten nicht aufgeführt). Möglicherweise ist neben dem pH-Wert und der Exsudation organischer Verbindungen der Sauerstoffgehalt des Bodens ein entscheidender Faktor für die Etablierung und die Antagonismusaktivität von *Trichoderma*, die durch die Atmungsaktivität von Wurzeln und Mikroorganismen sowie physikalisch durch den Wassergehalt des Bodens beeinflusst werden kann (WERNA, 1987).

#### 4.5.3 Sklerotien und Hirsekörner – Inokulum von *C. rolfii*

Für die Keimung, Etablierung und Besiedelung der Pilze im Boden spielen die Art der Pflanzen, die Temperatur, der Typ des Inokulums sowie die Nahrungsversorgung eine große Rolle. Bei den Inokulationsversuchen des Pathogens mit Sklerotien und Hirsekörnern war die Parasitierung der Pflanzen mit Hirsekörnern (Abb. 18, 19, 20) höher als mit Sklerotien (Abb. 17). Die höhere Wirksamkeit zeigte sich sowohl in Bezug auf die verwendete Inokulummenge der Sklerotien und der Hirsekörner als auch in der Mortalität der Pflanzen. Obwohl die Sklerotien *in vitro* eine Keimfähigkeit von 100 % zeigten, konnten sie in den Versuchen nur selten die Krankheit verursachen.

Die Entwicklung einer Krankheit wird nicht einseitig von den angreifenden Erregern, sondern wesentlich von der Art der Pflanzen und ihrem Widerstand gegen den Angriff bestimmt (KRANZ, 1996; SCHLÖSSER, 1997). Die Inokulation der Buschbohnen-, Linsen- und Kichererbsenpflanzen durch Hirsekörner mit *C. rolfii* führte zu bis zu 100% Mortalität der Pflanzen. Die verwendete Inokulummenge des Erregers war jedoch für jede Kulturpflanze verschieden, obwohl die Pflanzen alle zur Gruppe der Leguminosen gehören und gleich wichtige Wirte des Pathogens sind.

Nicht nur für das Auftreten der Krankheit, sondern auch für die Etablierung des Antagonisten im Boden und seine Wirksamkeit gegen den Erreger sind die Pflanzenarten von Bedeutung. Für eine erfolgreiche Applikation von *Trichoderma* spp. müssen für jedes Wirt – Pathogen - System die verschiedenen Faktoren und optimalen Bedingungen bekannt sein (PAPAVIZAS, 1985).

#### 4.5.4 Bodenbehandlung mit Konidiensuspensionen aus PDA-Medium

Das zunehmende Interesse an der Entwicklung von biologischen Bekämpfungsmethoden als Alternative zur konventionellen chemischen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten führte zur Entwicklung verschiedener Verfahren zur Erzeugung großer Mengen Biomasse von *Trichoderma* (ELAD et al., 1982; KÖHL, 1989). PAPAVIZAS et al. (1984) und HARMAN et al. (1991) erzeugten durch Fermenterbiomasse ein Inokulum des Antagonisten, das aus Myzel, Sporen und Chlamydosporen besteht, deren Propagulendichte in der Biomasse und deren Wirksamkeit in der biologischen Bekämpfung von der Qualität der Bio-Fermenter abhängig ist. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind für die biologische Bekämpfung gegen *C. rolfii* verschiedene Materialien und Methoden eingesetzt worden. Aus verschiedenen Nährmedien (PDA, Hirsekörner) erzeugte Biomasse von *Trichoderma* spp. wurde entweder in flüssigen Lösungen (Wasser, Gel) bei verschiedenen Konzentrationen im Boden und als Saatgutbeizung oder in festen Trägern (Hirsekörner) in verschiedenen Mengen im Boden verwendet und gegen *C. rolfii* auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Dabei zeigte sich, daß im Boden applizierte Konidiensuspensionen von *T. harzianum* (T040) aus PDA-Medium das Wachstum von *C. rolfii* verzögern, aber nicht vollständig

unterdrücken können. Die Bekämpfung von *C. rolfii* mittels Konidiensuspensionen aus PDA-Medium war nur für eine begrenzte Zeit wirksam. Der Effekt war jedoch nicht stark genug. Die antagonistische Wirksamkeit von *Trichoderma* wurde aufgehoben und als Folge wurden die Keimlinge durch den Pathogen angegriffen.

Eine Applikation von Konidien aus PDA-Medium von *Trichoderma* (T-040) in Konzentrationen Konidien/ml  $2 \times 10^7$  (TD3) zeigte je nach verwendeter Aufwandmenge (ml) unterschiedliche Wirkungsgrade gegen 10Cr<sub>2</sub> (Abb. 23). Die Effizienz des Antagonists war abhängig von der Menge der Konidienlösung, die im Boden von 1 bis 20 ml mittels Wasser gegossen wurde. Nach sieben Tagen wurde eine Wirksamkeit von 21,6 % bei 20 ml gegenüber 5 % bei 1 ml erreicht. Die Wirkung verringerte sich jedoch deutlich nach 14 Tagen, was auf die niedrige Anpassungsfähigkeit, den Nahrungszustand des Pilzes sowie auf die Qualität des Nahrungsangebots im Boden zurückgeführt werden konnte, was zur schnellen Reduktion des Inokulums von *Trichoderma* geführt haben könnte.

Sowohl die Konidienkonzentrationen als auch die Aufwandmengen sind nach den Ergebnissen entscheidende Faktoren für das Überleben, die Etablierung und für die Aggressivität des Pilzes, nachdem *Trichoderma* als biologisches Mittel gegen *C. rolfii* im Boden eingeführt wurde. Durch die Anwendung höherer Konidienkonzentrationen kann *Trichoderma* schnell ein Substrat besiedeln und aufgrund seines potentiellen Antagonismus erfolgreich einen Befall durch den Erreger verhindern. Die Besiedlung eines Substrates durch den Antagonisten ist vital für die Etablierung und Wirksamkeit von *Trichoderma* in Ökosystemen (FAULL, 1988). Jedoch ist bekannt, daß das Überleben und das Wachstum des Pilzes in natürlichem Boden vom Vorhandensein neuer Substrate als Nahrungsquelle abhängig ist.

Die Besiedlung eines Substrats sowie die Bekämpfung von bodenbürtigen Pilzen durch *Trichoderma* steht nicht nur in Zusammenhang mit der Zahl der Konidien und der Aufwandmenge, sondern auch mit dem Ernährungszustand des Pilzes. Das Vorhandensein großer Inokulumdichte des Antagonists könnte das Auftreten des Pilzes im Boden begünstigen und durch Nahrungskonkurrenz das Wachstum anderer Organismen unterdrücken. Es stellt sich die Frage, ob im Boden aufgrund der großen Zahl der Konidien eine intraspezifische Konkurrenz stattfindet, die eine Reduktion des Inokulums in kurzer Zeit verursachen kann.

Eine schnelle Keimung der Konidien in dem neuen Substrat ist neben der Nahrungskonkurrenz eine weitere wichtige Eigenschaft des antagonistischen Potentials von *Trichoderma*. Die Konidienkeimung hängt jedoch nicht nur von abiotischen (Temperatur, Feuchtigkeit, Bodentyp) oder biotischen Faktoren (Organismen) ab, sondern auch vom Ernährungszustand des Antagonists und seiner zukünftigen Nahrungsquelle, die sein Überdauern und seine Aggressivität bestimmen (PAPAVIZAS et al., 1984; FAULL, 1988).

*In vitro* liefert das Nährmedium PDA genügend Kohlenhydrate für das Wachstum und die Sporulation von *Trichoderma*, und der Pilz kann eine starke antagonistische Wirkung gegen *C. rolfii* zeigen. In Gewächshausversuchen war die Wirksamkeit von *Trichoderma* deutlich niedriger, was sich auf einen Nahrungsmangel zurückführen läßt, da der Pilz im Boden mittels Wasser appliziert wurde. Als Folge davon konnte nur eine niedrigere Keimung der Konidien stattfinden, die zusammen mit den anderen zuvor angesprochenen Faktoren die Effizienz des Antagonists verringerte.

Auch wenn eine höhere Konidienkeimung des Inokulums stattgefunden hätte, sind die Konidien während der Keimung aufgrund einer starken Nahrungskonkurrenz anfällig gegen das Phänomen der Lysis (KO & LOCKWOOD, 1970; FAULL, 1988). In eigenen Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Wirkung von *Trichoderma* spp. nicht nur von der

Konidien - Konzentration des Antagonisten, sondern auch von den Aufwandmengen abhängig ist.

Die Vermehrung und Aktivität von *Trichoderma* wird durch den Zersetzungsgrad des organischen Materials des Bodens beeinflusst. Wie bereits erwähnt, kann das Vorhandensein von organischen Verbindungen im Boden eine höhere Aktivität der Besiedlung durch Erreger und saprophytische Pilze verursachen, die eine bessere saprophytische Fähigkeit zur Konkurrenz als die Antagonisten haben (PAPAVIZAS & LUMSDEN, 1980). Ungünstige Faktoren können eine Etablierung und Vermehrung von *Trichoderma* stark beeinflussen, aber nicht die im Boden schon vorhandenen Mikroorganismen (BRUEHL, 1975). Für die eingeführten Antagonisten steht das anfängliche Substrat nur für kurze Zeit zur Verfügung, und es ist deshalb äußerst wichtig, daß neue Substrate in einer bestimmten Zusammensetzung hinzugefügt werden, damit die Dichte des Inokulums des Pilzes weiter zunehmen kann (FAULL, 1988).

#### 4.5.5 Saatgutbeizung mit Konidiensuspensionen aus Hirse-Medium

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für den Anbau gesunder Pflanzen ist die Verwendung eines von Krankheitserregern freien Saatgutes. Die Beizung ist eine Bekämpfungsmaßnahme, die das Saatgut von anhaftenden oder eingedrungenen Krankheitserregern befreit (BÖRNER, 1997). Mittels Applikationen von *Trichoderma* spp. auf das Saatgut können die Samen besser vor dem Angriff phytopathogener Pilze geschützt werden und die Wurzeln der Pflanzen können besiedelt werden (AHMAD & BAKER, 1987b).

Aus Hirsekörner-Medium gewonnene Konidiensuspensionen von *Trichoderma* spp. wurden als biologisches Beizmittel auf Buschbohnen - und Kichererbsen - Saatgut gegen unterschiedliche Inokulumkonzentrationen des Pathogens *C. rolfii* verwendet. Durch das Beizverfahren verteilt sich das Produkt gleichmäßig auf der Saatgutoberfläche. Stoffwechselprodukte von *Trichoderma* können so in den Samen eindringen und die Pflanze vor dem Befall mit samenbürtigen Erregern schützen (CHET et al., 1987). Die geprüfte mittlere Formulierung der Konidiensuspensionen ( $TD2 = 5 \times 10^6$  Konidien/ml) von *Trichoderma* erreichte nach neun Stunden Einquellzeit bei Buschbohnen (Abb. 24a) und Kichererbsen (Abb. 24b) einen unterschiedlich hohen Wirkungsgrad, der von der Inokulumkonzentration des Pathogens abhängig war. Je größer die Inokulummenge von *C. rolfii*, desto niedriger ist der Effekt des Antagonists. Durch die Verwendung einer mittleren Formulierung der Konidien/ml ( $TD2$ ) aus Hirsekörner-Medium als Beizsaatgut konnte eine noch bessere Bekämpfung von *C. rolfii* als bei Verwendung einer höheren Formulierung der Konidien/ml ( $TD3$ ) aus PDA-Medium bei der Bodenbehandlung erzielt werden. Ein möglicher Grund könnte die höhere Anzahl von Chlamydosporen in den Hirsekörnern sein, die im Boden lange Zeit überdauern können. Sie sind resistent gegen den Abbau anderer Bodenorganismen und haben eine bessere Keimrate als Konidien (PAPAVIZAS et al., 1984).

Für eine Etablierung des Antagonisten in einem neuen Substrat und seine Wirksamkeit gegen den phytopathogenen Erreger ist die Nährstoffbasis von großer Bedeutung (PAPAVIZAS & LEWIS, 1981; PAPAVIZAS et al., 1984). Eine mangelnde Haftung der flüssigen Konidiensuspensionen an der Oberfläche von Samen kann zu einer Verringerung der Konidienzahl im Boden führen (CHET et al., 1987; FAULL, 1988), was die begrenzte Wirksamkeit von *Trichoderma* und die Zunahme des Befalls von *C. rolfii* erklären kann.

#### 4.5.6 Saatgutbehandlung mit Konidiensuspensionen aus PDA- und Hirsemedium und Gel-Alginat

Bei Verwendung von Konidiensuspensionen von *Trichoderma* spp. zeigte sich, daß die erforderlichen Konzentrationen je nach Inokulummenge des Pathogens und der Art der Pflanze verschieden sein können. Wird bei einer Saatgutbehandlung mittels Konidiensuspensionen von *Trichoderma* spp. zusätzlich Alginat als Haftmittel verwendet, kann die Wirksamkeit des Pilzes zunehmen (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1985; CONWAY, 1986). Da die Konidien mit Hilfe des Gels an der Oberfläche der Samen haften bleiben, wird die Etablierung des Antagonisten im Boden gefördert. Durch die Zugabe von weiteren Nahrungsquellen im Boden konnte PAPAIVIZAS (1981) zeigen, daß es darüberhinaus zu einer starken Rhizosphärenkonkurrenz kommt und die Besiedlung von *Trichoderma* spp. weiter gefördert wird, und zwar sowohl bei der Anwendung der Konidiensuspensionen auf dem Saatgut als auch im Boden, wobei der Wirkungsgrad von *Trichoderma* wiederum abhängig ist von der verwendeten Inokulumkonzentration.

KNUDSEN & ESCHEN (1991) verwendeten Formulationen von *T. harzianum* mit Alginat Pellets in Konzentrationen von  $4 \times 10^2$  Konidien/ml gegen *Sclerotinia sclerotiorum* bei Erbsenpflanzen. Gurken -, Tomaten - und Paprikasamen wurden mit Konidien von *T. viride* in Konzentrationen von  $10^6$  Konidien/ml gegen verschiedene bodenbürtige Pilze behandelt (MENZIES, 1993). KÖHL & SCHLÖSSER (1989a) konnten mit einer aus MPA-Nährmedien gewonnenen Konidiensuspension in Konzentrationen von  $2,5 \times 10^8$  Konidien/ml in Alginatlösungen und in einer Dosis von 2 ml/10g Saatgut gegen *R. solani* erfolgreich schützen. Diese Anwendung hatte aber keine Wirkung gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae* und *Polymyxa betae*. LATUNDE-DADA (1993) verwendete Maisrückstände als Inokulumträger und Nahrungsquelle von *T. koningii* bei Tomatenkulturen gegen *C. rolfii*. Die Population von *Trichoderma* erreichte  $10^4$  bis  $10^6$  cfu/g Boden nach vier Wochen. Konidien von *T. hamatum* und *G. virens* konnten mittels Alginat-Weizen-Kleie-Granulat als Haftmittel und Nahrungsbasis für eine erfolgreiche Bekämpfung gegen die bodenbürtigen Pilze *R. solani* und *Pythium ultimum* eingesetzt werden (LEWIS et al., 1996); *T. harzianum* gegen *C. rolfii* bei Bohnenkulturen (PAPAIVIZAS & LEWIS, 1989); *T. harzianum* gegen *R. solani* bei Tomaten- und Bohnenpflanzen (HADAR et al., 1978). Letztere konnten weiter feststellen, daß eine Applikation von *Trichoderma* spp. zusammen mit einer zusätzlichen Nahrungsquelle das Wachstum und die Populationsdichte des Antagonists im Boden fördern. Das Gel als Haftmittel verbessert den Kontakt zwischen der Biomasse von *Trichoderma* und den Samen, wodurch der Wirkungsgrad von *Trichoderma* gegen *C. rolfii* deutlich erhöht wurde. Die Herstellung von *Trichoderma* - Formulationen in Alginat-Granulat und Pyrexpulver wird in weiteren Untersuchungen dargestellt (PAPAIVIZAS et al., 1984; FRAVEL et al., 1985; LEWIS & PAPAIVIZAS, 1987a; PAPAIVIZAS & LEWIS, 1989).

Aufgrund der Formulierung der Konidiensuspensionen/ml  $5 \times 10^5$  (TD1),  $5 \times 10^6$  (TD2),  $2 \times 10^7$  (TD3), der Nährstoffquelle für die Produktion des Inokulums von *Trichoderma* spp. (PDA-Hirsekörner) und der Einquellzeit zur Saatgutbehandlung kann die Effizienz der Beizung und damit die Wirksamkeit des Antagonisten variieren.

Die Wirkung von *Trichoderma*-Konidiensuspensionen (TD3) aus PDA-Medium erreichte nach sieben Tagen 36 % bei einer Einquellzeit von sechs Stunden. Eine Verbesserung der Wirkung von *Trichoderma* nach zwölf Stunden Einquellzeit war nicht gegeben (Abb. 25a, 25b). Eine höhere Wirksamkeit von *Trichoderma* gegen *C. rolfii* konnte in den Versuchen, in denen das Saatgut mit einer mittleren (TD2) und einer höheren Konidienkonzentration (TD3) aus Hirsekörner - Nährmedium und sechs Stunden Einquellzeit behandelt wurde, erzielt werden (Abb. 24a, 24b). Hier konnte eine Wirkung von 65 % bei Verwendung einer TD3 Konidienkonzentration erreicht werden.



Die in den Konidiensuspensionen enthaltenen kleinen Partikel von Hirsekörnern sind eine wichtige Nahrungsquelle, die für die Keimung und das Wachstum von *Trichoderma* notwendig sind. Bei der Produktion von *Trichoderma*-Präparaten zur Saatgutbeizung oder für die Bodenbehandlung wurden unterschiedliche Nährstoffe verwendet. HADAR et al. (1978); ELAD et al. (1981); SIVAN et al. (1984) und LEWIS et al. (1996) verwendeten Weizenkleie, PAPAIVAS et al. (1984) produzierten Biomasse von *Trichoderma* auf Bierhefe als Nahrungsquelle.

Eine starke Besiedlung durch den Antagonisten findet vor allem in der Nahrungsquelle statt, die es *Trichoderma* ermöglicht, ohne Schwierigkeiten im Boden weiter zu wachsen. DANIELSON & DAVEY (1973) und LEWIS & PAPAIVAS (1985) zeigten, daß sich *Trichoderma* und andere Antagonisten im natürlichen Boden besonders gut vermehren, wenn sie als junges Myzel in Kontakt mit einer Nahrungsbasis eingeführt wurden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Konidien während der Einquellzeit der Samen mit dem Keimungsprozeß anfangen. Werden sie dann im Boden mit den Samen eingeführt, können sie weiter wachsen und die Etablierung von *Trichoderma* und ihre Besiedlung im Boden wird ermöglicht. Die Wirksamkeit von *Trichoderma* kann jedoch wegen der Besiedlung der Nahrung durch andere Bodenmikroorganismen und der daraus resultierenden Konkurrenz oder aber wegen einer niedrigen Konidienkeimung als Folge einer Fungistasis des Bodens verringert werden (PAPAIVAS et al., 1984). Die Konidienproduktion sowie die Sporulation und das Wachstum von *Trichoderma* spp. können durch Feuchtigkeits- und Temperaturschwankungen sowie durch den Nahrungsinhalt beeinflusst werden (JIN et al., 1991).

#### 4.5.7 Applikationszeit und Konzentration des Inokulums

Die Konzentration sowie die Applikationszeit des Inokulums von *Trichoderma* spp. sind entscheidende Faktoren, die die Etablierung, Besiedlung und den Wirkungsgrad des Pilzes im Boden stark beeinflussen können.

Durch eine Applikation des *Trichoderma* - Inokulums vor der Aussaat können die Keimlinge während ihrer empfindlichen Zeit vor dem Befall durch den Erreger geschützt und ihre antagonistische Aktivität im Boden verlängert werden. ELAD et al. (1980) und PAPAIVAS (1985) erzielten durch eine Vorinokulation des Bodens eine deutlich höhere Wirkung von *T. harzianum* gegen *C. rolfii* an Bohnen. Außerdem zeigten sie, daß die Effizienz von *Trichoderma* von der Aufwandmenge des *Trichoderma* - Inokulums sowie der Inokulumkonzentration des Pathogens abhängig war. In den vorinokulierten Versuchen verringerte sich die Effektivität von *Trichoderma* spp. zwar nach 15 Tagen, die Wirksamkeit von *Trichoderma* war bei gekeimten gesunden Pflanzen aber immer noch höher als in den Versuchen, in denen das Inokulum des Antagonists gleich bei der Aussaat appliziert worden war (Abb. 27a,b; 28a,b). Durch eine Vorinokulation von *Trichoderma* bei einer ausreichenden Nahrungsversorgung scheint es also möglich, die Populationsdichte von *Trichoderma* zu fördern. Eine geringe Wirkung der Vorinokulation kann auf eine geringe Nahrungsversorgung als Folge einer starken Konkurrenz mit anderen Organismen zurückgeführt werden. LEWIS & PAPAIVAS (1984) erzielten eine Steigerung der Population von *Trichoderma* im Boden durch eine Applikation von Kleie als Nahrungsquelle. KNUDSEN & BIN (1990) zeigten dagegen, daß eine Versorgung mit Kleie nur zu einer schwachen Entwicklung der Population von *Trichoderma* spp. führte. Durch eine Zugabe von Nahrungsquellen im Boden kann auch eine starke Rhizosphärenkonkurrenz und Besiedlung von *T. harzianum* gefördert werden, wenn Konidiensuspensionen als Saatgut- oder als Bodenbehandlung appliziert werden (PAPAIVAS, 1981). Die Zunahme der Population von *Trichoderma* spp. nach der Applikation im Boden kann ein wichtiges Kriterium für die Selektion von *Trichoderma* mit antagonistischem Potential für die biologische Bekämpfung sein (LEWIS & PAPAIVAS, 1985).

#### 4.5.8 Antagonistischer Mechanismus von *Trichoderma*

In der Bekämpfung zahlreicher Pathogene durch die Applikation von Konidiensuspensionen von *Trichoderma* in Form von Saatgut- oder Bodenbehandlung sind verschiedene Mechanismen die Hauptverursacher für die Unterdrückung des Erregers (PAPAVIZAS, 1985; CHET, 1989). HARMAN et al. (1980) konnten feststellen, daß vor allem bei *T. hamatum* ein Hyperparasitismus gegen *Pythium ultimum* stattfindet. Für LIFSHITZ et al. (1986), NELSON & POWELSON (1988), FAULL & SCARSELETTI (1994) und WHILHITE et al. (1994) ist die Produktion von Antibiotika der Verursacher einer Wachstumshemmung von bodenbürtigen Pilzen wie *Pythium*, wenn *Trichoderma* zur Saatgutbehandlung verwendet wurde. In anderen Untersuchungen ist der Mechanismus der Konkurrenz von *Trichoderma* im Boden für die Bekämpfung von bodenbürtigen Pilzen verantwortlich gemacht worden (DUBOS et al., 1982; KÖHL & SCHLÖSSER, 1991; LO, 1996). Die Inzidenz einer oder mehrerer Mechanismen und ihr Wirkungsgrad ist von der Wechselbeziehung Antagonist – Pathogen – Wirt abhängig (MELO, 1997).

Durch die Produktion antibiotischer Substanzen kann die Besiedlung von *Trichoderma* in der Wurzel ermöglicht werden, da die Etablierung anderer Mikroorganismen unterdrückt wird (GARRETT, 1970). Sowohl die Produktion von antibiotischen Substanzen als auch die höhere Aktivität von *Trichoderma* spp. in der Rhizosphäre sind bei der Wachstumshemmung der Pilze von großer Bedeutung (LIFSHITZ et al., 1986). Die Fähigkeit von *Trichoderma*, in der Rhizosphäre mit anderen Bodenorganismen zu konkurrieren, wird durch die Produktionszunahme der Enzyme Exo- und Endo- $\beta$ -1,4-Glucanasen unterstützt, die Cellulose abbauen. Es wird angenommen, daß *Trichoderma* spp. dieses Substrat besser als andere Mikroorganismen besiedeln können (AHMAND & BAKER, 1987a).

In einigen Arbeiten war die Zugabe von Nährstoffen zum Samen zur Erhöhung der Wirksamkeit von *Trichoderma* erfolglos (JIN et al., 1991; LEWIS et al. 1996). Dies läßt darauf schließen, daß wahrscheinlich die Substanzen und Verbindungen, die während der Samenkeimung und des Wurzelwachstums ausgeschieden werden, sowohl von *Trichoderma* spp. als auch von den Pathogenen als wichtige Nahrungsquelle ausgenutzt werden. Das Auftreten des Antagonisten oder des Pathogens wird vom Wirtstyp sowie der Qualität und Quantität der freigesetzten Substanzen gefördert.

#### 4.6 Kosten der Konidienproduktion

Bei der Anwendung biologischer Bekämpfungsmaßnahmen spielt nicht nur der Faktor Zeit, sondern auch der Faktor Kosten eine große Rolle. Je kürzer die Zeit und je niedriger die Kosten, die für die Produktion des Antagonisten – Inokulums erforderlich sind, und je höher seine Wirksamkeit gegen die Pathogene, desto höher ist seine Akzeptanz als biologisches Bekämpfungsmittel in der Landwirtschaft.

Die Fortschritte der Biotechnologie haben in den letzten Jahren zu einer Zunahme des Wissens über die Vermehrung von Mikroorganismen geführt, die in der Industrie für die Herstellung zahlreicher Säuren, Antibiotika, Enzyme usw. eingesetzt werden (SMITH et al., 1980). Die Anwendung solcher biotechnologischen Verfahren bietet die Möglichkeit, Biomasse von *Trichoderma* spp. in großen Mengen zu produzieren und gegen bodenbürtige Pilze einzusetzen, wegen der Kosten der Materialien ist die Nutzung jedoch derzeit begrenzt (PAPAVIZAS et al., 1984).

Die Nutzung von Hirsekörnern als Nahrungsquelle und für die Inokulumproduktion von *Trichoderma* spp. ist eine günstige und ökonomische Alternative, mit der nicht nur große Mengen von Biomasse produziert werden können, sondern mit der aufgrund des guten Nahrungsangebots der Ernährungszustand des Pilzes und damit seine antagonistische

Wirksamkeit deutlich verbessert werden kann. Die Anwendung dieser Alternative zur Vermehrung von *Trichoderma* bringt darüberhinaus keine Kontaminationsprobleme mit sich. Auch kompostierte Rinde, Weizen-Kleie und Melasse sind neben anderen Substraten als Nahrungsquelle und für die Inokulumproduktion von *Trichoderma* spp. verwendet worden. Neben Faktoren wie Feuchtigkeit, Temperatur, Nährstoffversorgung und Pflanzentyp führt die vollkommene Besiedelung eines Substrats zu einer Wirkungssteigerung des Antagonisten (EASTBURNE & BUTTLER, 1991; JIN et al., 1991). Die Nutzung von Alginat als Haftmittel von Konidien an der Samenoberfläche bei der Saatgutbeizung zeigt, daß das auf Hirsekörnermedium und das auf dem PDA Medium hergestellte Inokulum von *Trichoderma* eine gleich hohe Zunahme der Wirkung des Antagonisten gegen *C. rolfii* hat. Durch die Eigenschaft des Gels, die Konidien an die Samen zu binden, wird bei der Saatgutbehandlung mit *Trichoderma* insgesamt eine niedrigere Menge an Konidien benötigt als ohne das Gel. Außerdem kann es eine Besiedlung des Antagonisten im Boden begünstigen (TAYLOR & HARMAN, 1990). Unter Kosten – Nutzen – Gesichtspunkten ist dieses Mittel somit das günstigste und gleichzeitig wirksamste Bekämpfungsmittel.

#### 4.6.1 Lagerungsbedingungen

Bei der Entwicklung biologischer Produkte wie *Trichoderma* spp. und anderen Antagonisten muß auch ihre Überlebensfähigkeit unter bestimmten Lagerungsbedingungen berücksichtigt werden (LEWIS & PAPAIVAS, 1984). Nach Meinung der beiden genannten Autoren spielt insbesondere die Bildung von Chlamydosporen sowohl für die Überdauerung als auch für die Wirksamkeit eine große Rolle. So läßt sich die Effizienz von T-040 mit ihrer Fähigkeit, eine große Anzahl von Chlamydosporen zu bilden, erklären. Auf flüssigem Hirsekörnermedium konnte der Pilz nicht nur große Mengen von Biomasse produzieren, sondern auch nach sechsmonatiger Lagerung bei 5 °C aktiv bleiben und sogar wirksamer sein als frische Kulturen (Abb. 30). Hirsemehl als Nahrungsquelle im Medium hat möglicherweise während der Lagerung das Überleben und seine Aktivität unterstützt. *Trichoderma* war in der Lage, sich diesen Lagerbedingungen anzupassen, und sich, als er in Gewächshausversuchen bei Temperaturen von ca. 25 °C im Boden appliziert wurde, weiter zu vermehren und das Substrat zu besiedeln. Die Biomasse von *Trichoderma* spp. kann besser und länger bei 5 °C überleben als bei 25 °C oder 30 °C (PAPAIVAS et al., 1984).

#### 4.6.2 Zugelassene Präparate

Mittlerweile sind weltweit schon einige kommerzielle Präparate von *Trichoderma* als biologisches Mittel gegen verschiedene Schaderregergruppen entwickelt und als Samenbeizung verwendet oder im Boden eingepflügt werden (COOK, 1997). **Trichodex**™, **Binab-T**™ und **GlioGard GLIOGARD**® werden erfolgreich in verschiedenen Kulturen appliziert (ELAD & SHTIENBERG, 1996; HAYES et al., 1997). Andere Biopräparate von *Trichoderma* sind aufgrund ihrer niedrigen Wirkungsgrade und schwankender Bekämpfungssicherheit nicht weit verbreitet (ELAD & SHTIENBERG, 1996).

#### 4.7 Induzierte Resistenz durch *Trichoderma*

Die Effizienz von *Trichoderma* spp. sollte nicht nur aufgrund ihres antagonistischen Potentials gegen die Pathogene bewertet werden, sondern auch aufgrund ihrer Fähigkeit, wachstumsstimulierende Substanzen zu bilden, die das Wachstum der Pflanzen fördern können (CHANG et al., 1986; BAKER, 1989; CHET, 1989; KLEIFELD & CHET, 1992), und der

Fähigkeit, in den Pflanzen eine natürliche Resistenz gegen den Angriff von Erregern zu aktivieren (MEYER et al., 1998; YEDIDIA et al., 1999).

In den eigenen Versuchen zeigten die mit *Trichoderma* spp. behandelten Samen und Böden eine positive Auswirkung sowohl auf den Aufgang als auch auf das Pflanzenwachstum von Buschbohnen und Kichererbsen, die auf die Bekämpfung von sekundären Pathogenen in der Rhizosphäre sowie auf die Produktion von Pflanzenhormonen zurückgeführt werden könnte (BEYRLE, 1995). Jedoch ist nicht ausgeschlossen, daß *Trichoderma* spp. gegen den Befall unterschiedlicher Pathogene auf das Wurzelgewebe einwirken und bei der Wirtspflanze eine natürliche Abwehrreaktion durch eine Akkumulation bestimmter Moleküle induzieren (YEDIDIA et al., 1998).

Eine Resistenzzunahme mit metabolischen Veränderungen, wie z.B. Verstärkung der Peroxidaseaktivität und Synthese phenolischer Verbindungen, wurde in Lauchpflanzen (SPANU et al., 1988) nachgewiesen. Hydrolasenakkumulation z.B. von Chitinasen und  $\beta$ -1,3 Glucanasen, war in Lauch- und Erbsenpflanzen vorhanden (DUMAS et al., 1984). Die Zunahme der Produktion von Peroxidasen und phenolischen Verbindungen werden als Schlüssel im Resistenzprozess betrachtet (DALISAY & KUC., 1995). Durch die Akkumulation struktureller Stoffe kann die mechanische Stärke der Zellwand des Wirtes zunehmen und der Pathogenbefall wird eingeschränkt oder gehemmt (YEDIDIA et al., 1998). Gleichzeitig äußerten sich einige biochemische und morphologische Veränderungen bei Gurkenpflanzen, als sie mit *Trichoderma* spp. inokuliert wurden (YEDIDIA et al., 1998). Nach 48 Stunden konnte eine Zunahme der Aktivität von Peroxidasen und Chitinasen sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern mit *Trichoderma* behandelter Keimlinge beobachtet werden. Dies führte zu dem Schluß, daß *Trichoderma* spp. eine systemische Resistenz in den Pflanzen induzieren können.

In solchen Untersuchungen wurde erkennbar, daß trotz der Aktivierung des Enzyms Chitinase diese nicht der entscheidende Faktor in der Expression der Resistenz der Pflanzen ist, die mit *Trichoderma* inokuliert wurden. Die Bildung struktureller Barrieren und die Synthese toxischer Substanzen wie phenolische Verbindungen und Phytoalexine gehen der Produktion der Chitinase und anderer PR-Proteine voran (YEDIDIA et al., 1998).

Bei den mit *Trichoderma* behandelten Gurkenpflanzen wurde eine Aktivierung der Peroxidase vor der Chitinase 48 h nach der Inokulation beobachtet. Die Peroxidasen spielen neben der Funktion der Ligninbildung (PRELL, 1996) und der Akkumulation phenolischer Verbindungen (WARD, 1986) auch bei der Entstehung aktiver Sauerstoffverbindungen wie dem Superoxidradikal ( $O_2^-$ ), dem Hydroxylradikal ( $HO^\cdot$ ) und dem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die zur oxidativen Vernetzung der Zellwand führt (PRELL, 1996; SCHLÖSSER, 1997), eine besondere Rolle. Sowohl die phenolischen Verbindungen als auch die Sauerstoffverbindungen könnten sich auch als direkt erregewirksam erweisen (SCHLÖSSER, 1997).

Eine Bestimmung der Abwehrreaktion der Buschbohnen- und Kichererbsenpflanzen nach einer Behandlung mit *Trichoderma* spp. gegen den Angriff von *C. rolfii* war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, doch gab es in den Versuchen zum *Trichoderma* – Pathogen - System eine unterschiedliche Befallsinzidenz von *C. rolfii* an den Pflanzen. Diese zeigte sich nicht nur in der Zahl der abgestorbenen Pflanzen, sondern auch in der Länge des Zeitraums, während dem sich die Pflanzen gegen den Angriff des Erregers wehren konnten. Bei den allein mit dem Pathogen inokulierten Samen erreichten die Keimlinge in den meisten Fällen nicht die Bodenoberfläche. Es ist somit denkbar, daß *Trichoderma* spp. neben den bekannten antagonistischen Mechanismen wie Antibiotikaproduktion, Enzymaktivität während des Hyperparasitismus und Nahrungskonkurrenz in der Rhizosphäre auch die Fähigkeit hat, das Pflanzenwachstum zu stimulieren und eine Resistenz während der

kritischen Perioden der Keimlinge gegen den Befall des Pathogens zu aktivieren (GHISALBERTI & SIVASITHAMPARAM, 1991; HARAN et al., 1993; HARAN et al., 1996; MEYER et al., 1998).

Obwohl in den letzten Jahren das Interesse an *Trichoderma* spp. in der biologischen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten sowie für das Pflanzenwachstum zugenommen hat, hat der Pilz bisher wenig Aufmerksamkeit als ein potenzieller Resistenzinduktor erhalten (DE MEYER et al., 1998).

#### 4.8 Systemisch Aktivierte Resistenz durch Bion®

Um durch phytopathogene Erreger verursachte Schäden zu minimieren und gleichzeitig eine höhere Produktivität im landwirtschaftlichen Kulturanbau zu erreichen, werden weltweit synthetische Pflanzenschutzmittel appliziert (JONES et al., 1991). Sie verursachen nicht nur höhere Kosten für die Landwirte. Ihre kontinuierliche Anwendung und die stetig zunehmende Applikationsmenge schaden Umwelt und Menschen gleichermaßen und haben dazu geführt, daß zahlreiche pathogene Pilze Resistenzen gegen Fungizide entwickelt haben (GURKIN & JENKINS, 1985; LIFSHITZ et al., 1986; PHILIPP, 1996;). Dadurch wird eine wirksame Bekämpfung zunehmend erschwert (MENZIES & BELANGER, 1996). Durch die Anwendung von Resistenzinduktoren (SIEGRIST et al., 1997) sowie durch bestimmte biotische und abiotische Faktoren (SCHLÖSSER, 1997) können Pflanzen ihre eigenen Abwehrmechanismen gegen einen Pathogenbefall aktivieren.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Fungiziden stellt die Verwendung des kommerziellen Induktors **BION®** im Pflanzenschutz eine neue ökonomische und umweltschonende Methode dar, die aufgrund der geringen Aufwandmenge und einer sehr geringen Toxizität gegenüber den Wirtspflanzen keine Gefahr einer Resistenzbildung von Pathogenen mit sich bringt und Anwendern, Umwelt und Verbrauchern nicht schadet. BION® aktiviert die natürliche Abwehr der Pflanzen und repräsentiert somit eine neue Form des Pflanzenschutzes (ANONYM, 1996; GÖRLACH et al., 1996; KIRSTIN et al., 1999).

Pflanzen werden in der Regel von vielen verschiedenen Pathogenen angegriffen. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, daß sie sowohl durch präformierte konstitutive Barrieren als auch durch induzierte Abwehrmechanismen in einem frühen Stadium das Wachstum und die Entwicklung eines angreifenden Pathogens hemmen oder unterdrücken können (KESSMANN et al., 1994; MURILLO et al., 1999; STICHER et al., 1997). Die Fähigkeit eines Organismus, den Angriff eines Schaderregers abzuwehren, wird als Resistenz bezeichnet (AUST et al., 1991).

Der Einsatz von BION® Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-Methylester-Benzothiadiazole (BTH) (SIEGRIST et al., 1997) stellt neben anderen Verbindungen eine Alternative zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten dar, deren Wirkung auf einer Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR) gegen den Pathogenangriff basiert. Dieses Phänomen ist ein durch ein Pathogen oder eine chemische Verbindung stimulierter Prozess, durch den zahlreiche Abwehrmechanismen der Pflanzen aktiviert werden. So wird bei einem Pathogenbefall die Penetrationsstelle des Schaderregers zur Abwehr verstärkt. Aber auch das Resistenzniveau in der ganzen Pflanze steigt (ROSS et al., 1961; ANFOKA & BUCHENAUER, 1996; SCHLÖSSER, 1997; KNOESTER et al., 1999; HAN et al., 2000). Die Effektivität solcher Abwehrmechanismen ist abhängig von der Invasionsgeschwindigkeit des Pathogens und der Aufbaugeschwindigkeit mechanischer Barrieren durch die Pflanzen (SCHLÖSSER, 1997; MURILLO et al., 1999).

Die meisten der bisher durchgeführten Untersuchungen mit BION® als Resistenzinduktor haben sich nur auf bestimmte monokotile Pflanzen, wie Weizen, Gerste und Reis, konzentriert. Andere Untersuchungen haben bewiesen, daß die Anwendung des Resistenzinduktors BION® auch in dikotylen Pflanzen und gegen verschiedene Schaderreger

wirksam sein kann. Die Effektivität des Resistenzinduktors gegen bodenbürtige Pilze wie *C. rolf sii* und andere Erreger ist in der Literatur dagegen kaum zu finden. In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals näher ermittelt, ob die Anwendung von BION® WG 50 und BION® 100 EC in bestimmten Konzentrationen eine phytotoxische Wirkung an Leguminosenpflanzen verursacht. Anschließend wurde getestet, ob durch unterschiedliche Applikationsmethoden von BION® eine Resistenz gegen *C. rolf sii* induziert werden kann. Dafür wurde der Induktor auf Samen und Laubwerk von Buschbohnen-, Linsen-, Kichererbsen-, Erbsen- und Ackerbohnenpflanzen und auf den Boden appliziert.

#### 4.8.1 Phytotoxische Wirkung von BION® WG 50 und BION® 100 EC

BION® WG 50 hatte in den Dosierungen von 20 und 40 µg/ml bei ein bis vier Stunden Einquellzeit keine phytotoxische Wirkung auf den Aufgang und die Pflanzenlänge von Buschbohnen (Tab. 22). Die Keimung der Bohnensamen, das Flächenwachstum sowie die Pflanzenlänge wurden im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle sogar deutlich gefördert, was auch bei einigen anderen Resistenzinduktoren beobachtet werden konnte. Für diese Förderung war unter anderem eine gesteigerte CO<sub>2</sub>-Assimilation und damit verbunden eine verbesserte Photosyntheseleistung verantwortlich (KRASKA, 1996). Nach acht und zwölf Stunden Einquellzeit wiesen die Pflanzen im allgemeinen beim Aufgang sowie bei der Pflanzenentwicklung sichtbare phytotoxische Effekte auf.

In verschiedenen Versuchen wurden die Keimlinge von Buschbohnen, Kichererbsen, Linsen und Erbsen nach dem Aufgang mit BION® WG 50 besprüht. Dabei wurden Konzentrationen von 5, 10, 20 und 40 µg/ml BTH auf die oberirdischen Teile der Pflanzen appliziert. Die Versuchsergebnisse (Tab. 23) zeigten, daß die Wirkung der unterschiedlichen Dosierungen des Resistenzinduktors je nach Kultur variieren kann. Buschbohnen konnten eine Dosis von 20 µg/ml gut vertragen. Ihr Wachstum wurde leicht gefördert. Dagegen führten bei Kichererbsen bereits 10 µg/ml zu einer Verringerung des Pflanzenwachstums. Die verschiedenen Behandlungen mit BTH an Linsenpflanzen zeigten keine phytotoxischen Wirkungen, sie konnten 10 µg/ml gut vertragen. Anwendungen von 20 und 40 µg/ml führten dagegen zu einer Verringerung der Pflanzenlänge der Linsen. Die Applikation von BION® an Erbsen wirkte in allen Behandlungen positiv im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die höchste Wirkung zeigte sich bei 20 µg/ml, die Pflanzen konnten Mengen von bis zu 40 µg/ml gut aushalten, ohne negative Auswirkungen zu zeigen. Wie in anderen Versuchen konnte auch hier eine Zunahme des Wachstums festgestellt werden. Generell kann festgestellt werden, daß der Wirkungsgrad des Induktors vom Kulturtyp und der Dosierung abhängig ist. In vielen Fällen war eine zu hohe Dosierung die Ursache für Wachstumsdepressionen, Chlorosen und ein Einrollen der Blätter (z.B. bei Buschbohnen bei 40 µg/ml).

In weiteren Versuchen wurden BION® Suspensionen von 20 µg und 40 µg/ml in Mengen von 5, 10 und 20 ml in den Boden gegossen und ihre Effekte auf das Pflanzenwachstum der Buschbohnen untersucht (Abb. 28a, b). Die Lösungen wurden durch die Wurzeln in den oberirdischen Teil der Pflanzen transportiert. Die Anwendung von 20 µg/ml zeigte in allen Varianten (5, 10 und 20 ml) nach dem Aufgang der Pflanze eine positive Wirkung hinsichtlich der Pflanzenlänge. Bei 40 µg/ml gab es keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, obwohl eine Zunahme des Wachstums bei der mit BION® behandelten Pflanzen beobachtet wurde. Bodenbehandlungen mit zwei Applikationen nach dem Aufgang der Pflanzen zeigten keine Wachstumsförderung, die Pflanzen waren kleiner als die der unbehandelten Kontrolle.

In anderen Versuchen wurde die phytotoxische Wirkung von BION® 100 EC, dessen Formulierung besonders gut für die Samenbehandlung geeignet ist und das zu diesem Zweck im Markt eingeführt worden ist, getestet. Für die Saatgutbeizung von Buschbohnen,

Kichererbsen und Ackerbohnen wurden Suspensionen von 12,5, 25, 50, 100 und 200 µg/ml getestet (Tab. 24). Obwohl keine Variante einen signifikanten Einfluß auf den Aufgang von Buschbohnen und Kichererbsen zeigte, waren die Keimlinge schon bei 50 µg/ml schlecht entwickelt. Höhere Konzentrationen führten zu Wachstumsdepressionen sowie Farb- und Formveränderungen der Pflanzen. Bei Ackerbohnen hatten die entsprechenden Konzentrationen weder auf den Aufgang noch auf das Pflanzenwachstum negative Auswirkungen, was wahrscheinlich auf der starken Samenschale der Ackerbohnen beruht, die nur einer verringerte Aufnahme des aktiven Wirkstoffes zuläßt.

Behandlungen von neun Stunden in Konzentrationen von 12,5, 25 und 50 µg/ml von BION<sup>®</sup> 100 EC beeinflussten bei Buschbohnen und Kichererbsen den Aufgang sowie die Pflanzenhöhe in unterschiedlichem Maße. Bei beiden Kulturen waren die Werte niedriger als die der unbehandelten Kontrolle (Abb. 33a, 33b).

Wegen der niedrigen phytotoxischen Wirkung von 12,5 µg/ml von BION<sup>®</sup> 100 EC wurden die Buschbohnen in Zeiten von 1, 2, 4, 8 und 12 Stunden behandelt (Abb. 34). Bei allen Varianten gab es keine signifikanten Unterschiede beim Aufgang der Pflanzen, ab 8 Stunden Behandlungszeit verringert sich der Aufgang. Positiv wirkte BTH in einer Konzentration von 12,5 µg/ml und bei einer Einquellzeit von ein bis vier Stunden auf die Pflanzenhöhe von Buschbohnen.

#### 4.8.2 Versuche zur Induzierten Resistenz gegen *C. rolfii*

Der Induktor bewirkt in einer Vielzahl von Pflanzen und gegen zahlreiche phytopathogene Pilze eine Systemisch Aktivierte Resistenz (SAR). Diese basiert auf multiplen Abwehrvorgängen, die nach dem Befall eines Pflanzenteils in den übrigen befallsfreien Teilen eine stark erhöhte Widerstandskraft gegen nachfolgende Infektionen mit dem gleichen Erreger oder anderen Pathogenen auslöst (SCHLÖSSER, 1997).

Aufgrund der Fähigkeit, die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen den Angriff von Schaderregern zu aktivieren, wurde der Resistenzinduktor Benzothiadiazol (BTH) BION<sup>®</sup> WG 50 und BION<sup>®</sup> 100 EC hier gegen *C. rolfii* getestet, einem Pilz, dessen Lebensform auf perithotropher Ernährungsweise basiert.

Applikationen von BION<sup>®</sup> als Resistenzinduktor wurden besonders erfolgreich auf dem Laubwerk der Pflanzen durchgeführt. Sie führten nicht nur zur Reduktion des Befalls durch verschiedene phytopathogene Pilze, sondern gleichzeitig auch zur Reduktion des Einsatzes von Fungiziden und in einigen Fällen sogar zur Steigerung der Erträge (BARGMANN et al., 1992). Es wurde daher geprüft, ob ein Besprühen des Laubwerks mit BION<sup>®</sup> und dessen Verwendung als Beizmittel auf Saatgut von Buschbohnen, Linsen und Kichererbsen zu einer Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR) führt und somit vor dem Angriff von *C. rolfii* schützt.

Die Samen von Buschbohnen, Linsen und Kichererbsen wurden mit Konzentrationen von 5, 10, und 20 µg/ml BION<sup>®</sup> WG 50 sechs Stunden behandelt. Innerhalb dieses Zeitraums sollte die Resistenz initiiert werden. Die Inokulation von *C. rolfii* (HCr<sub>2</sub>) fand auf der Oberfläche des Bodens statt. Auf diese Weise wurde vermieden, daß das Inokulum des Erregers einen direkten Kontakt mit den Samen hatte. Nach fünf Tagen wurde die Wirksamkeit der Induzierten Resistenz anhand des Aufgangs ausgewertet. Bei den mit 5 µg/ml BION<sup>®</sup> behandelten Buschbohnen lag ein Prozentsatz von 33 % Mortalität gegenüber 63 % bei den nur mit dem Pathogen behandelten Samen vor. Eine ähnliche Effizienz wurde auch bei Dosierungen von 10 und 20 µg/ml BION<sup>®</sup> erreicht (Abb. 35a). Bei Kichererbsen lag die Mortalität der nur mit dem Pathogen inokulierten Samen bei 100 % gegenüber 43 % bei den mit 10 µg/ml BION<sup>®</sup> behandelten Samen (Abb. 35b). Bei Behandlungen mit 5 und 20 µg/ml

zeigte die Induzierte Resistenz deutlich weniger Wirkung. Bei Linsen waren nach 20 Tagen 43% der mit 10 µg/ml BION<sup>®</sup> behandelten Pflanzen abgestorben gegenüber 93% bei den nur mit dem Pathogen inokulierten Samen (**Abb. 35c**). Bei allen Versuchen, in denen die Samen mit BION<sup>®</sup> behandelt wurden, zeigte sich eine deutliche Befallsreduktion des Erregers.

Die Effektivität solcher Abwehrmechanismen hängt von der Invasionsgeschwindigkeit des Pathogens, der Aufbaugeschwindigkeit mechanischer Barrieren und chemischer Abwehrmechanismen durch die Pflanzen ab (SCHLÖSSER, 1997; YANG et al., 1997; MURILLO et al., 1999). So wurde beobachtet, daß die Pflanzen nach einiger Zeit die Wirksamkeit der Induzierten Resistenz wieder verlieren und sie dann nicht mehr in der Lage sind, den Angriff von *C. rolfii* abzuwehren. Da nicht die genetische Konstitution der Pflanzen verändert wird, ist die Wirkungsdauer der Induzierten Resistenz meistens zeitlich begrenzt (STICHER, 1997). Im Falle eines Restbefalles durch *C. rolfii* kann es daher zu einem späteren Zeitpunkt zu einer steigenden Mortalität und zu Ertragsdepressionen kommen. Durch eine gesteigerte Anwendungshäufigkeit des Induktors kann die Wirkungsdauer der Induzierten Resistenz aber verlängert werden (SCHÖNBECK et al., 1981). Je nach Pflanzentyp (YANG et al., 1997) können verschiedene Faktoren, wie z.B. Umweltbedingungen (FALKHOF et al., 1988), die Ausbildung der Induzierten Resistenz bzw. die Ausprägung der aktivierten Verteidigungsmechanismen stark beeinflussen.

In Versuchen, in denen die Samen mit Sklerotien von *C. rolfii* inokuliert wurden, konnten die Pflanzen innerhalb von fünf Tagen aufgehen. In diesem Zeitraum zwischen Keimung und Auflaufen waren die Sklerotien in den meisten Fällen nicht 100%ig fähig, die Keimlinge zu befallen. Die Sklerotien brauchten noch zwei bis drei Tage, bis sie keimen und wachsen konnten und infektionstüchtig waren. Waren die Keimlinge aufgelaufen, wurden sie mit dem Resistenzinduktor BION<sup>®</sup> WG 50 besprüht (**Abb. 36a**). Die Wirksamkeit einer Aktivierung der Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen den Befall von *C. rolfii* war bei der Mehrzahl der Pflanzen nach 20 Tagen sichtbar. Die Zahl der aufgelaufenen Pflanzen bei der unbehandelten Kontrolle (ohne Pathogen und ohne Bion Behandlung) erreichte nach der Keimung 100% gegenüber 76 % bei 20 µg/ml BION<sup>®</sup> mit dem Pathogen und nur 10 % bei den nur mit dem Pathogen inokulierten Pflanzen. STEINER et al. (1988) berichten, daß nach der Aktivierung der Abwehrmechanismen die Toleranz der Pflanzen gegen den Angriff phytopathogener Pilze steigt. Auf diese Weise kann eine Induzierte Resistenz auch bei Kulturpflanzen-Sorten exprimiert werden, die keine Resistenzgene gegen einen bestimmten Erreger enthalten (SCHLÖSSER, 1997). Ein höherer Wirkungsgrad der Induzierten Resistenz ergab sich bei den mit 10 und 20 µg/ml BION<sup>®</sup> behandelten Pflanzen. Er verringerte sich, wenn die Konzentration des Induktors auf 40 µg/ml erhöht wurde. Es wurde in anderen Versuchen beobachtet, daß Behandlungen der Blätter mit 5, 10 und 20 µg/ml das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen fördern und daß Dosierungen von 40 µg/ml BION<sup>®</sup> eine phytotoxische Wirkung hatten.

Die Anwendung von BION<sup>®</sup> WG 50 zur Erzeugung der Induzierten Resistenz konnte hinsichtlich Anzahl und Gewicht (g) der Früchte ausgewertet werden (**Abb. 36b**). Die Anzahl der Früchte der unbehandelten Kontrolle war höher als bei und signifikant verschieden von den mit BION<sup>®</sup> und dem Pathogen zusammen behandelten Pflanzen. Dagegen war das Gewicht der Früchte bei den mit 20 µg/ml BION<sup>®</sup> behandelten Pflanzen höher als das der unbehandelten Kontrolle und als die anderen Behandlungen. STEINER (1988) erwähnt, daß induzierte Pflanzen einen höheren Schaderregerbefall tolerieren können, ohne daß es zu Ertragsverlusten kommt. Je nach Kulturpflanze und Induktorklasse kann die Ertragsleistung jedoch variieren. Anzahl und Gewicht der Früchte verringerten sich deutlich bei 40 µg/ml.

Neben der Induzierten Resistenz der Buschbohnen gegen *C. rolfii* konnte durch die Applikation von BION<sup>®</sup> die Ertragsleistung verbessert werden, was wahrscheinlich auf einen leistungsfähigeren Wassertransport zurückgeführt werden kann, wie in Tomatenpflanzen



nachgewiesen wurde (BARGMANN et al., 1992). Es ist aber nötig, weitere Untersuchungen der Wirkung von BION® auf den Krankheitsbefall und seinen Einfluß auf den Ertrag wichtiger landwirtschaftlicher Kulturen durchzuführen.

Mittels verschiedener Inokulationsmethoden wurde der Effekt der Induzierten Resistenz auf Buschbohnen- und Kichererbsen untersucht, die mit dem Inokulum von *C. rolfii* (HCr<sub>2</sub>) zusammen und getrennt inokuliert wurden. In beiden Kulturen, in denen das Inokulum mit dem Pathogen zusammen appliziert wurde, konnten die Keimlinge weder aufaufen noch eine Resistenzinduktion zeigen. Innerhalb von fünf Tagen erreichte die Zahl der abgestorbenen Pflanzen 98% bei Buschbohnen und 100% bei Kichererbsen (Abb. 37a,b). Möglicherweise konnten die Samen während des Keimungsprozesses bzw. in den frühen Entwicklungsstadien aufgrund der Nähe und des schnellen Befalls von *C. rolfii* keine bzw. keine wirksamen Abwehrmechanismen bilden. Durch das Zusammentreffen von prädisponierten und anfälligen Pflanzenorganen und Pathogen war sowohl eine räumliche als auch eine zeitliche Koinzidenz gegeben, die zur Ausprägung der Krankheit führte (SCHLÖSSER, 1997).

Für eine Aktivierung der pflanzlichen Abwehrmechanismen ist ein Zeitintervall zwischen der Applikation des Induktors und der Inokulation des Erregers notwendig. In diesem Zeitraum haben die Pflanzen die Möglichkeit, die erforderlichen Verteidigungsmechanismen zu bilden, mit denen der Angriff von *C. rolfii* abgewehrt werden kann. Je nach Kulturart, Umweltbedingungen und Erreger kann die Länge des Zeitintervalls variieren (STICHER, 1997).

In den Versuchen, in denen die Buschbohnen- und Kichererbsensamen keinen Kontakt mit dem Inokulum von *C. rolfii* hatten, konnten die Samen aufgrund des Abstands zum Pathogen keimen und aufaufen. Während der Keimung und des Aufgangs konnten die Pflanzen den Prozess der Resistenzinduktion durchführen, so daß das Pathogen zu dem Zeitpunkt, an dem es die Pflanzen erreichte, einerseits mit den bereits vorhandenen konstitutiven Barrieren und andererseits mit dem bereits aktivierten Abwehrmechanismus der Pflanze konfrontiert wurde. Die durch eine Resistenzinduktion erhöhte Widerstandsfähigkeit konnte die Etablierung des Schaderregers zumindest für eine bestimmte Zeit verzögern, so daß bei fehlender zeitlicher Koinzidenz zwischen einem prädisponierten anfälligen Pflanzenorgan und dem Pathogen ein Krankheitsausbruch verhindert werden konnte (SCHLÖSSER, 1997). Auch die Anzahl aufgelaufener Pflanzen war deutlich höher als bei alleinigem Befall durch das Pathogen. Die Dosis von 12,5 µg/ml und eine Behandlungszeit von 4 Stunden führte zu einer besseren Wirkung als höhere Konzentrationen, was sich nicht nur in einer Reduktion der Wirksamkeit der Induzierten Resistenz, sondern auch in phytotoxischen Wirkungen wie Wachstumshemmung und Deformation der Blätter äußerte.

Bei der Induzierten Resistenz der Pflanzen werden einige Abwehrmechanismen aktiviert, die durch Pathogene (ONGENA et al., 2000) oder bestimmte Verbindungen (Elicitoren) ausgelöst werden können (INBAR et al., 1999). An der Aktivierung solcher Mechanismen sind darüberhinaus verschiedene biochemische Vorgänge beteiligt, die zur Erhöhung des pflanzlichen Stoffwechsels sowie zur Synthese und Aktivität einiger Enzyme führen können. Die Rolle der Elicitoren und bestimmter Bodenmikroorganismen als Resistenzinduktoren sowie die Wirksamkeit solcher Abwehrmechanismen sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (ELTSNER, 1996; PRELL et al., 1996; AGRIOS, 1997; DURNER et al., 1997; JACKSON, 1997; LYON & NEWTON, 1997; SCHLÖSSER, 1997; SIEGRIST et al., 1997; STICHER et al., 1997; INBAR et al., 1998; LOON et al., 1998; PURKAYASTHA, 1998; VAN LONN et al., 1998; KIRSTIN et al., 1999; KNOESTER et al., 1999; SPLETZER & ENYEDI, 1999; CAMERON, 2000; COLSON-HANK & DEVERALL, 2000; DANN & DEVERALL, 2000; ENEBAK & CAREY, 2000; JEUN et al., 2000; ONGENA et al., 2000; REUVENI et al., 2000; TREUTTER, 2000; TRILLAS et al., 2000).

Möglicherweise läßt sich die Befallreduktion von *C. rolfii* in einigen Versuchen auf eine Systemisch Aktivierte Resistenz (SAR), ausgelöst durch die Applikation von BION<sup>®</sup>, zurückführen. Einige induzierbare pflanzliche Barrieren schließen Zellwandmodifikationen, Veränderungen der Plasmamembran sowie die Veränderung der Genregulation ein (KEEN, 1992). Zellwandmodifikationen sind physikalische Barrieren, die bei der Resistenzinduktion gebildet werden (DALISAY & KUC, 1995; ELSTNER, 1996; PRELL, 1996; SCHLÖSSER, 1997; TRILLAS et al., 2000). Die Veränderung der Zellwände der Pflanzen und die dabei beteiligten Produkte wie Lignin, Kallose, hydroxiprolinreiche Zellwandproteine und Silikatablagerungen (LANGEN et al., 1998) konnten den Etablierungsprozess von *C. rolfii* zumindest einige Zeit verzögern, bis sich die Pflanze entwickeln und andere Resistenzmechanismen aktivieren kann (STICHER et al., 1997).

Bei der Systemisch Aktivierten Resistenz findet die Expression einiger Familien von PR-Proteinen, wie  $\beta$ -1,3-Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3), statt (CENTURY et al., 1995; WARD et al., 1991), die durch das SAR-Gen kodiert werden (WARD et al., 1991). Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen haben eine antifungale, synergetische Wirkung (MAUCH et al., 1988) und werden durch Abwehrsysteme von Pflanzen gegen phytopathogene Pilze (ELSTNER, 1996) und Insekten (INBAR et al., 1998) gebildet. Beide Enzyme finden sich in spezifischen pflanzlichen Rezeptoren des Plasmalemmas und wirken dort als Elicitoren zur Aktivierung der Signaltransduktionskette in den Pflanzen (KUROSAKI, 1986; NIDERMAN et al., 1995; SCHLÖSSER, 1997). Bei der Expression der  $\beta$ -1,3-Glucanasen und Chitinasen findet auch die Synthese der Enzyme Phenylalanin-Amonium-Lyase (PAL) und Chalkon-Synthase (CHS) statt, die zusammen mit den Peroxidasen als Schlüsselenzyme der Resistenzmechanismen der Pflanzen betrachtet werden (ANFOKA & BUCHENAUER, 1996; PRELL, 1996; SCHLÖSSER, 1997). Durch die Erhöhung der Aktivitäten der PAL und Peroxidasen wird bei der Induktion der Abwehrmechanismen der Pflanzen die Synthese phenolischer Verbindungen weiter verstärkt (ELSTNER, 1996), die in der Zellwand als Abwehrstoffe der Pflanzen gegen den Erregerbefall gebildet werden (NÜRNBERGER et al., 1994; PRELL, 1996; BENHAMOU & BELANGER, 1998).

Die Aktivierung solcher Abwehrmechanismen, die bei der Unterdrückung der Entwicklung mehrerer phytopathogener Pilze wirksam sind, ist in der gesamten Pflanze nach der Applikation von BION<sup>®</sup> in mehreren Forschungsarbeiten nachgewiesen worden (SIEGRIST et al., 1997; KIRSTIN et al., 1999; DANN & DEVERALL, 2000). Daher ist anzunehmen, daß diese und andere Abwehrmechanismen bei Buschbohnen- und Kichererbsen nach BION<sup>®</sup>-Behandlungen gegen den Angriff von *C. rolfii* induziert und die SAR aktiviert wurde und damit die Resistenz der Pflanzen erhöht wurde. BENHAMOU & BELANGER (1998) berichten, daß eine höhere Akkumulation phenolischer Stoffe am Penetrationsort von *Pythium ultimum* stattfand und die Bildung mechanischer Barrieren gegen den bodenbürtigen Pilz unterstützten. Eine Akkumulation von Salicylsäure (SA) nach Applikation von BION<sup>®</sup> in pflanzlichem Gewebe (SCHLÖSSER 1997) könnte bei der Resistenzinduktion von Bedeutung sein (METRAUX et al., 1990; DURNER et al., 1997).

In Laufe der umfangreichen Versuche zur Resistenzinduktion wurde bei den verschiedenen Leguminosenpflanzen beobachtet, daß die Effektivität der Abwehrmechanismen von der Befallgeschwindigkeit des Pathogens sowie der Aufbaugeschwindigkeit mechanischer Barrieren durch die Pflanze abhängig ist. Eine Samenbeizung mit BION<sup>®</sup> kann erfolgreich sein, wenn im Boden keine hohen Konzentrationen des Pathogeninokulums vorkommen oder wenn die Samen keinen Kontakt mit dem Erreger haben, wodurch ihre Anwendung und ihre Wirksamkeit gegen bodenbürtige Pilze begrenzt sein könnte. Applikationen von BION<sup>®</sup> sind nach den Erfahrungen mehrerer Untersuchungen gegen wichtige Blattkrankheiten unterschiedlicher Kulturen zu empfehlen. Aufgrund der Unspezifität von BION<sup>®</sup> kann die Entwicklung mehrerer Krankheitserreger gleichzeitig verzögert werden. Wegen seiner

geringen Toxizität für die Umwelt ist BION<sup>®</sup> eine Alternative zum Fungizideinsatz. Die Wirkungsgrade der Induzierten Resistenz können durch den Einfluß mehrerer Faktoren wie z.B Temperatur, Dosis und Applikationsmethode des Induktors, und je nach Pflanzenart und Pathogenart variieren. Die Anwendung von BION<sup>®</sup> verspricht in Zukunft eine neue Möglichkeit der Bekämpfung phytopathogener Pilze.

Abschließend kann festgestellt werden, daß bestimmte Mikroorganismen wie *Trichoderma* spp. als biologisches Mittel sowie die Anwendung von BION<sup>®</sup> als Resistenzinduktor der Pflanzen in der Landwirtschaft in Kombination mit anderen Methoden erfolgreich zur Bekämpfung zahlreicher Pflanzenkrankheiten eingesetzt werden können. Dabei verspricht die Anwendung von *Trichoderma* spp. vor allem während der kritischen Infektionsperioden der Pflanzen eine hohe Wirksamkeit gegen bodenbürtige Pathogene, BION<sup>®</sup> besonders gegen Blattkrankheiten. Besonders interessant erscheint eine Kombination beider Verfahren, deren Potential aber noch eingehender untersucht werden muß.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Suche nach alternativen Bekämpfungsstrategien gegen phytopathogene Pilze ist eine Antwort auf die Notwendigkeit, die Dosierungen und die Zahl synthetischer Fungizide zu verringern. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Untersuchung die Wirksamkeit von *Trichoderma* spp. als biologisches Mittel und BION® Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-Carbothionsäure-S-Methylester-Benzothiadiazole (BTH) als Resistenzinduktor zur Kontrolle von *Corticium rolfii* getestet.

### 5.1 Untersuchungen von *Trichoderma* spp. und *C. rolfii* *in vitro*

Obwohl eine Selektion potentieller antagonistischer Pilze anhand *in vitro* durchgeführter Plattentests nur selten mit den Ergebnissen im Gewächshaus oder im Freiland übereinstimmt, sind Ermittlungen der morphologischen Eigenschaften wie Farbe, Wachstumsgeschwindigkeit, Aggressivität und Wirkungsspektrum dennoch hilfreich und notwendig. Die Pigmentation sowie die Sporulation und in einigen Fällen die Wachstumsform stehen in engem Zusammenhang mit den Nährmedien. Die Verwendung von PDA-, MPA- und PDYA-Nährmedien *in vitro* erwiesen sich sowohl für das Wachstum von *C. rolfii* als auch für *Trichoderma* spp. und für die Bewertung ihrer antagonistischen Wirkung als geeignet. Die Benutzung von Hirsemehl in Mengen von 10, 20 oder 40 g/l zeigte nicht nur, daß dieses eine wichtige Nahrungsquelle für die Pilze darstellt, wobei sowohl das Wachstum als auch Sporulation gefördert sein können, sondern aufgrund der niedrigen Kosten auch eine Alternative zu Labormaterialien ist.

Bei niedrigen Temperaturen reagierten die meisten *Trichoderma*-Stämme nicht nur hinsichtlich Wachstum und Sporulation, sondern auch in Bezug auf ihr Antagonismuspotential ganz unterschiedlich.

Toxische Substanzen von *Trichoderma* spp. konnten in Dualkulturen je nach den *Trichoderma*-Stämmen, den Nährmedien und der Inokulationszeit das Wachstum von *C. rolfii* sehr stark hemmen, ihn aber nicht abtöten. Sie sind aber zusammen mit der Enzymaktivität und der Konkurrenzfähigkeit entscheidende Mechanismen des Antagonismuspentials von *Trichoderma* spp., die zum Absterben des Pilzes führen. Mit Hilfe eines Selektivmediums konnte der Antagonismus von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* nachgewiesen werden.

Aufgrund ihres breiten Spektrums sind *Trichoderma* spp. auch gegen andere bodenbürtige Pilze wie *Pythium debaryanum*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* und *Rhizoctonia solani*, wirksam.

### 5.2 Gewächshausversuche

Bei Inokulationen der Pflanzen mit *C. rolfii* spielen die Distanz zum Wirt, die Tiefe, die Menge und der Typ des Inokulums des Pathogens im Boden eine besondere Rolle. Hirsekörner als Inokulumträger von *C. rolfii* waren wirksamer als Sklerotien. Hirsekörner können ebenfalls als Nahrungsquelle und Inokulumträger von *Trichoderma* spp. verwendet werden.

Mit Hilfe von Hirsekörnern kann Biomasse von *Trichoderma* in großen Mengen und in kürzerer Zeit produziert werden als mit anderen Nährmedien. Das Hirsekörner-Medium stellt für das Wachstum der Pilze eine wichtige Nahrungsquelle dar, wobei der Pilz mehrere

Monate gelagert werden kann, ohne seine Wirksamkeit zu verlieren. Wegen der sehr niedrigen Kosten und der einfachen Bearbeitung bietet die Verwendung von Hirsekörnern einen klaren ökonomischen Vorteil.

Die Aktivität und Effizienz von *Trichoderma* spp. gegen *C. rolfii* kann in einem natürlichen Ökosystem durch die Formulierung, die Aufwandmenge, die Applikationsmethode, die Applikationszeit des Inokulums, den allgemeinen Nährzustand des Pilzes, den Inokulumträger sowie die Inokulumkonzentration des Pathogens, die Wirtspflanze, die Temperatur, den Bodentyp, die Feuchtigkeit des Bodens und das Auftreten von Fungiziden beeinflusst werden.

Die Applikation von *Trichoderma* spp. durch einen geeigneten Träger mit ausreichenden Nährstoffen steigert bei der Saatgut - oder Bodenbehandlung seine Wirksamkeit gegen *C. rolfii*. Eine Vorinokulation des Bodens mit Konidien suspensionen von *Trichoderma* spp. führte ebenfalls zur Steigerung der Effizienz des Antagonisten bei der Bekämpfung von *C. rolfii*.

Gegen die meisten der hier getesteten Wirkstoffe, die in der Praxis für die Saat- und die Pflanzenbehandlung eingesetzt werden, sind *Trichoderma*-Pilze unempfindlich. Die Resistenz einiger *Trichoderma*-Stämme gegen wichtige Pflanzenschutzmittel bietet die Möglichkeit der Anwendung biologischer Präparate in Kombination mit Fungiziden.

Die Effizienz von *Trichoderma* spp. sollte nicht nur wegen ihres antagonistischen Potentials gegen die Pathogene bewertet werden, sondern auch wegen ihrer Fähigkeit, das Wachstum von Pflanzen zu fördern und eine natürliche Resistenz gegen den Angriff von Erregern zu aktivieren.

### 5.3 Phytotoxische Wirkung von BION® WG 50 und BION® 100 EC

Der Wirkungsgrad von BION® variiert je nach Konzentration, Pflanzenart und Applikationsmethode. Es konnte festgestellt werden, daß BION® WG 50 in den entsprechenden Dosierungen von 20 und 40 µg/ml bei ein bis vier Stunden Behandlungszeit keine phytotoxische Wirkung hatte. Applikationen von BTH der oberirdischen Teile der Keimlinge von Buschbohnen mit 20 µg/ml, Kichererbsen 5 µg/ml, Linsen 10 µg/ml und Erbsen bis 40 µg/ml führten zu erheblichen Verbesserungen des Pflanzenwachstums. Lösungen von BION® können in den Boden gegossen werden und durch die Wurzeln sehr gut in den oberirdischen Teil der Pflanzen transportiert werden. Dieses Verfahren ist aber wegen der erforderlichen großen Aufwandmenge ökonomisch nicht sinnvoll.

BTH 100 EC in Konzentrationen von 12,5 µg/ml bei einer Samenbehandlung von ein bis vier Stunden wirkt positiv auf die Keimfähigkeit und die Höhe der Pflanzen. Dosierungen über 25 µg/ml führen zu Wachstumsdepressionen.

### 5.4 Aktivierte Resistenz gegen *C. rolfii*

Die Wirksamkeit der Resistenzinduktoren BION® WG 50 und BION® 100 EC, die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen den Angriff von *C. rolfii* zu aktivieren, hängt von der Inokulumkonzentration, dem Inokulumtyp sowie der Distanz des Inokulums zu den Samen ab.

Bei Inokulationen mit Sklerotien von *C. rolfii* konnten die Keimlinge auflaufen und reagierten nach Besprühen mit 10 und 20 µg/ml BION® WG 50 mit einer Systemisch Aktivierten Resistenz (SAR). Die Anwendung der Resistenzinduktoren führte zur Reduzierung der Anzahl der Früchte, konnte aber deren Gewicht (g) steigern. Durch einen

Restbefall von *C. rolfii* kann es zu einem späteren Zeitpunkt zu einer steigenden Mortalität und zu Ertragsdepressionen kommen.

Die Wirkung der SAR kann unter dem Einfluß mehrerer Faktoren wie Temperatur, Dosis und Applikationsmethode des Induktors und je nach Pflanzenart und Pathogenart variieren.

In den meisten Versuchen, in denen die Samen mit Hirsekörnern als Inokulumträger von *C. rolfii* inokuliert worden waren, konnten die Keimlinge weder auflaufen noch eine Resistenzinduktion zeigen. In diesen Fällen hängt die Effektivität der Abwehrmechanismen von der Invasionsgeschwindigkeit des Pathogens und der Aufbaugeschwindigkeit mechanischer und chemischer Barrieren durch die Pflanzen ab.

Abschließend kann festgestellt werden, daß bestimmte Mikroorganismen wie *Trichoderma* spp. als biologisches Mittel sowie die Anwendung von BION<sup>®</sup> als Resistenzinduktor der Pflanzen in der Landwirtschaft in Kombination mit anderen Methoden erfolgreich zur Bekämpfung zahlreicher Pflanzenkrankheiten eingesetzt werden können. Dabei verspricht die Anwendung von *Trichoderma* spp. vor allem während der kritischen Infektionsperioden der Pflanzen eine hohe Wirksamkeit gegen bodenbürtige Pathogene, BION<sup>®</sup> besonders gegen Erreger von Blattkrankheiten. Wegen ihrer geringen Toxizität für die Umwelt, Anwender und die Verbraucher pflanzlicher Lebensmittel sind *Trichoderma* spp. und BION<sup>®</sup> eine beachtenswerte Alternative zum Fungizideinsatz.

## SUMMARY

Sundries types of beans as well as lentils, chick peas, peas and field-beans are important essential footstuffs in Middle and South America. Because of their high nutritional value and the versatile uses they are more and more often cultivated in many countries. Their production is limited by phyto-pathogen viruses, bacterias and fungi as well as by insects and herbs. The partially very high profit reduction is not only an economic problem for the farmers but endangers also the food-care of the population.

Most diseases are caused by fungi. Seeds, seedlings, leaves and fruits in the field and the harvest-property in the warehouse are threatened by fungus-like viruses constantly. Of particular importance are soil fungi like *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* and *Corticium rolfsii*, which cause damping off of seedlings.

Considerable profit and quality decreases in tropical and subtropical areas can be reduced often by the application of synthetic fungicides only. The development of *C. rolfsii* and other phyto-pathogen fungi admittedly can be hindered through their application, however, simultaneously also populations of useful fungi, like for example antagonists, can be suppressed. This can lead to the appearance of other diseases, which were previously without economic meaning. Due to an increasing selection of fungicide-resistant strains of fungus-like viruses certain fungicides in many countries can no longer be used.

Alternatively, worldwide biological methods against pathogenes using different microorganisms have been under testing for some time. *Trichoderma* spp., attracted particular interest because of their high antagonistic potential against fungus-like pathogenes, especially against soil fungi.

The search for alternative methods of controlling plant diseases is a response to the need of reducing the dose as well as the number of chemical products applied worldwide. For this reason this research undertook to evaluate the effectiveness of *Trichoderma* spp. as a method of biological control, and of BION<sup>®</sup> Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (BTH) which induces resistance against *Corticium rolfsii*. A combination of *Trichoderma* and BION<sup>®</sup> could be an alternative to the use of synthetic fungicides and an important component of an integrated disease management.

### 6.1 Research with *Trichoderma* spp. And *C. rolfsii* in vitro

In the control against pathogens and above all against soil pathogens, which are especially difficult to control, in numerous researches *Trichoderma* spp. Has been successfully developed and used as a natural control method.

Despite the fact that morphological studies carried out under laboratory conditions on coloration, speed of growth, aggression and effectiveness of potentially antagonistic fungi greenhouse or under field conditions, there are however necessary for the selection of strains of *Trichoderma*.

PDA, PDYA and MPA media promote the growth of *C. rolfii* and *Trichoderma* spp., and help to assess the antagonistic potential of the fungus. Its growth lies on these media between 20 and 21 mm/24hrs and can even reach up to 30 mm/24hrs.

The Sclerotia are the primary inoculum source of the pathogen. However, their number can vary depending on the nutritional media, temperatures, pH or because of the appearance of fungicides or other organisms. The optimum temperature for the germination of the sclerotia is 30 °C, at temperatures of 8 °C and 40 °C the germination of the sclerotia is suppressed. In the greenhouse at temperatures of 28 °C and with high humidity the attack of *C. rolfii* is favored. Under these conditions, the sclerotia germinate very quickly and form a mycelium, that extends on the ground-surface and on the attacked plants.

At low temperatures, most *Trichoderma* strains reacted quite differently not only regarding growth and sporulation but also their antagonistic potential. The *Trichoderma* strains *T. koningii* (T-165), *T. harzianum* (T-040), *T. hamatum* (T-093), *T. harzianum* (T-257) and *T. harzianum* (T-391) have a growth rate of +/- 25 mm/24hrs. The nutritional media PDA, PDYA and MPA are adequate for the growth of the fungi.

Selecting *Trichoderma* spp., beside other climatic conditions one must keep an eye particularly on the temperature conditions, under which *Trichoderma* has the ability to develop and to become active. An antagonism of *T. koningii* (T-165), *T. harzianum* (T-040), *T. hamatum* (T-093), *T. harzianum* (T-257) and *T. harzianum* (T-391) did not take place at 5 °C and their growth was low or was stopped, which agrees with the results of KÖHL (1989).

For a selection of *Trichoderma* strains, beside their aggression also their tolerance of cooler temperatures is therefore a necessary criterion. Liquid cultures of *T. koningii* (T-165) and *T. harzianum* (T-040) with millet outlasted at 5 °C for one year without losing their antagonistic potential. The use of millet-flour in quantities of 10, 20 or 30 g/l showed not only that it represents a great food-source for the fungi, with which growth as well as sporulation can be promoted, but that it is due to the low expenses also an alternative to laboratory materials.

Depending on the species of *Trichoderma*, the duration of the inoculation, the temperature and the method of feeding, it is possible to stop the growth of *C. rolfii* through the means of volatile and non-volatile toxic substances of *Trichoderma* spp, but impossible to kill it. Besides the production of enzymes during the parasitism and the capacity to compete for space and food, these substances are important antagonistic mechanisms of *Trichoderma* spp. which finally lead to the destruction of the fungus. Gliotoxin and gliovirin produced by *Trichoderma* spp., can be involved in protection of seedlings from *C. rolfii*.

*Trichoderma harzianum* (T-040) attacked the mycelium of the pathogen when the nutrient media was PDA, this attack, however, was much more rapid and efficient in the presence of millet-flour. Phase-contrast microscopy showed degradation of *C. rolfii* mycelium in regions of interaction with the antagonistic fungus. Such mycoparasitism was observed by scanning electron microscopy.

The production of any enzymes as  $\beta$ -(1-3) glucanase and chitinase can be the key enzymes in the lysis of fungal cell walls of *C. rolfii*. In vitro it was possible to check the antagonism of *Trichoderma* against *C. rolfii* with the help of a selective medium.

Under laboratory-conditions, one determined that most tested *Trichoderma* spp. Have a higher sensitivity against fungicides of the groups benzothiadiazole like benomyl and



carbendazim as well as prochloraz of the group imidazoles. Of the investigated material, T-391, an isolate of *T. harzianum*, proved as extremely resistant against benomyl and was not even influenced by 50 µg/mls in its mycelium-growth. In combination with benomyl, this strain would be suitable for an integrated control. A prerequisite would be that the fungus-like virus to be fought reacts sensitively to benomyl. However, this was not the case with *C. rolfii*.

Their antagonistic effect even reaches other important pathogenic fungi in the soil such as *Pythium debaryanum*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 6.2 Greenhouse experimentation

In plants inoculated with *C. rolfii*, the distance of the inocula to the host, the depth, the quality as well as the type of inocula play an important role. Greenhouse experiments showed that the granules of millet were the best carriers of the inocula for *C. rolfii*, even better than sclerotia. They were also used as sources of food as well as carriers of inocula for *Trichoderma* spp.

It should be noted that millet can be produced easily, in a short period of time, in great quantities at low cost. For the growth of fungi, millet constitutes the main source of food. For this reason the fungi may be stored for long periods of time without losing their effectiveness. For the low cost of production of inocula, millet is economically of advantage.

The use of biocontrol agents to minimize damping-off is an alternative disease management strategy when growers are concerned over seed phytotoxicity from fungicides. The antagonistic activity of *T. harzianum* (T-040) was observed as a significant decrease in *C. rolfii* damage to beans, lentils and chick peas during the experiments. The decreasing percentage of diseases on plants was positively correlated with the increasing amount of *T. harzianum* preparation added to the soil. This preparation remained active during the growth cycle of beans.

The activity and efficiency of *Trichoderma* spp. as a biological agent against *C. rolfii* may be affected in natural ecological systems by their formulation, the amount applied, the method and duration of application, the fungus nutritional status, the type of carrier of the inocula as well as the concentration of the inocula of the pathogen, the type of plant, the temperature, the type of soil, the humidity of the soil and the presence of fungicides.

The application of *Trichoderma* spp., through a carrier ready for inocula with sufficient quantities of food increases the efficiency of the control against *C. rolfii* in seed treatments and in soil. The pre-inoculation of the soil with suspensions of *Trichoderma* spp. also increases the efficiency of the antagonistic fungus in the control of pathogenic fungi.

With the increasing interest in developing alternatives to chemical fungicides, mass production of *Trichoderma* for use as bioprotectants has become a focus of industrial research and development. Liquid fermentation is the method of choice for producing biomass, because large facilities are available. A critical barrier to the mass production of *Trichoderma* is the lack of suitable media and methods for producing large amounts of high-quality biomass in a short period of time. The quality of a microbial bioprotectant is dependent on the propagule density in the biomass, its ability to survive processing requires drying to avoid contamination and spoilage of the biomass. Hyphae, chlamydospores, and conidia are the propagules of *Trichoderma* which were produced for the experiments. PDA and millet-

flour media were suitable for the biomass production of *trichoderma* spp. Millet media promoted the growth and the conidia formation. To be used for biological control of plant pathogens fungal biomass must be economical to produce, able to withstand desiccation, and stable storage conditions.

*Trichoderma* spp. Were tolerant against the majority of chemical products tested in the research. Their resistance against some fungicides makes them an alternative for use in combination with chemical products in integrated systems of control.

The effectiveness of *Trichoderma* spp. should not be seen solely for their antagonistic capacity, but also for their being able to induce the growth of plants and possibly for their capacity to activate a natural resistance against the attack of pathogens.

### 6.3 Phytotoxicity of BION<sup>®</sup> WG 50 and BION<sup>®</sup> 100 EC

The effectiveness of BION<sup>®</sup> WG 50 varies with its concentration, the type of plant and the method of application. BION<sup>®</sup> WG 50 in concentrations of 20 and 40 µg/ml when soaked between 1-4 hours, does not produce phytotoxic effects. Applications of BION<sup>®</sup> on the leaves of bean plants with 20 µg/ml, on lentils with 10 µg/ml and on peas with up to 40 µg/ml produce positive effects on their growth. The application of BION<sup>®</sup> on the soil can lead to its transportation through the roots to the leaves, but on account of the fact that large amounts are needed, from the economic point of view this method can not be recommended.

BION<sup>®</sup> 100 EC, when applied in concentrations of 12.5 µg/ml and when left to soak for between 1.4 hours, has no effect on the germination nor the height of the plants. However, doses of above 25 µg/ml, do lead to depressive growth in the plants.

### 6.4 Induction of Resistance against *C. rolfii*

The effectiveness of BION<sup>®</sup> WG 50 and BION<sup>®</sup> 100 EC as inducers of resistance, which provoke the plants' natural defence mechanisms against *C. rolfii*, depends on the concentration of the inocula, the type of inocula as well as the distance between the inocula of the pathogen and the seeds.

In inoculations with sclerotia of *C. rolfii*, small saplings could be seen, the same as those applied with a dose of 10 and 20 µg/ml BION<sup>®</sup> WG 50. Resistance was activated. The use of the inducer led to a reduction in the number of fruits, but led to an increase in the weight of *C. rolfii*, whilst what remained of the inocula could once again attack the plants and result in limited harvest.

The effect of the activated resistance (SAR) may be influenced by factors such as temperature, dosage, the way the inducer has been applied, as well as the type of plant and the type of pathogen.

In most of the experiments in which the seeds were inoculated with millet as carriers of the inocula of *C. rolfii*, there was no germination of saplings nor was resistance activated. It can be supposed that its effectiveness in activating the defence mechanisms of the plant depends on the speed with which the pathogen invades, as well as the speed with which the plants can form defence barriers.

Biological and chemical control of soil pathogens is voluminous. It covers seed treatments, soil fungicides, modification of cultural practices, amending soil with plant residues and specific substances to induce changes in soil microflora, and direct introduction of biological antagonists into soil. Fungicides are practical and widely used, but can favor other pathogens. Moreover, the use (often extensive and excessive) of chemicals for pest control is a growing concern to public health authorities and environmentalists. With the exclusion of crop sequence and fertilization practices, however, practical use of biological control of root diseases has been doubted on both theoretical and practical grounds. Integration of biological and chemical control seems to be a very promising way of controlling pathogens with a minimal interference with biological equilibrium.

Finally, it was possible to show that different micro-organisms like *Trichoderma* spp., as agents of biological control, and BION<sup>®</sup> as an inducer of plant resistance, may be successfully used as a method of controlling plant diseases. The use of *Trichoderma* spp., especially during the critical period of infection, can protect plants from attacks of soil fungi, whereas BION<sup>®</sup> best influences diseases affecting the leaves of plants. Due to their low toxicity for the environment, *Trichoderma* spp. and BION<sup>®</sup> represent an alternative to the use of fungicides.

## 7 RESUMEN

La búsqueda de metodos alternativos contra los hongos fitopatógenos es una respuesta a la necesidad de disminuir las dosis y el número de productos químicos, que en muchos países son utilizados sin ningun tipo de medidas de control. Por ello fue investigado en este trabajo la efectividad de *Trichoderma* spp. como un medio de control biologico y BION® Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (BTH) como un inductor de resistencia para el control de *Corticium rolfii*.

### 7.1 *Trichoderma* spp. und *C. rolfii* in vitro-

A pesar de que los estudios morfologicos realizados en Laboratorio, como coloracion, velocidad de crecimiento, agresividad y efecto antagonico no siempre concuerdan con los resultados de Invernadero o Campo, son sin embargo necesarios para la selección de cepas de *Trichoderma*. El uso de los medios alimenticios PDA, PDYA y MPA demostraron ser aptos para el crecimiento de *C. rolfii* y *Trichoderma* spp. asi como tambien para evaluar el potencial antagonista del hongo. El uso de harina de Mijo en cantidades de 10, 20 o 40 g/l mostró no solamente que es una importante fuente de alimento que estimula el crecimiento y la esporulación de los hongos, sino tambien que por su bajo costo es un material alternativo a los materiales de laboratorio.

A temperaturas bajas reaccionaron la mayoria de las especies de *Trichoderma* no solo desde el punto de vista de crecimiento y esporulación, sino tambien en relación a su potencial antagonista.

Dependiendo de la especie de *Trichoderma*, del medio alimenticio, y del tiempo de inoculación, el hongo produjo sustancias volatiles toxicas que pudieron detener el crecimiento de *C. rolfii*, pero no lograron matarlo. Tales sustancias, junto con la produccion de enzimas durante el parasitismo y la capacidad de competición por espacio y alimento son importantes mecanismos antagónicos de *Trichoderma* spp. que produjeron mas tarde la supresión del hongo patógeno. Mediante medios selectivos se pudo comprobar el antagonismo de *Trichoderma* spp.

Su efecto antagonista alcanza hacia otros importantes hongos patógenos del suelo como *Pythium debaryanum*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Rhizoctonia solani*.

### 7.2 Ensayos en Invernadero

En las inokulaciones de las plantas con *C. rolfii* juega un papel importante la distancia del inóculo con el hospedero, la profundidad, cantidad asi como el tipo de Inóculo. En los ensayos de invernadero demostraron ser los gránulos de Mijo los mejores portadores del inóculo de *C. rolfii* que los esclerocios. De esa manera tambien se utilizaron como fuentes de alimento y portadores de inóculo para *Trichoderma* spp.

Mediante el uso de granos de Mijo se puede producir en poco tiempo grandes cantidades de Biomassa de *Trichoderma* que en otros medios de cultivos. Mijo constituye para el crecimiento de los hongos una fuente principal de alimento. De esa manera pueden ser

almacenados por largo tiempo sin que pierdan su efectividad. Por sus bajos costos de producción de inóculo, Mijo representa una ventaja económica.

La actividad y eficiencia de *Trichoderma* spp. como un agente biológico contra *C. rolfsii* puede ser influenciado en los sistemas ecológicos naturales por su formulación, cantidad aplicada, por el método de aplicación, tiempo de aplicación, estado alimenticio del hongo, del tipo del portador del inóculo así como de la concentración del inóculo del patógeno, del tipo de planta, de la temperatura, del tipo de suelo, del pH, de la humedad del suelo y de la presencia de fungicidas

La aplicación de *Trichoderma* mediante un portador apto del inóculo con cantidades suficientes de alimento puede aumentar la eficiencia de control contra *C. rolfsii* en tratamientos de la semilla y del suelo. Igualmente mediante una pre-inoculación del suelo con suspensiones de *Trichoderma* spp. conduce a un aumento de la eficiencia del hongo antagonista en el control de los hongos patógenos.

De igual manera mediante la aplicación de *Trichoderma* spp. con una fuente de alimento puede inducir tanto el crecimiento como el aumento de la población del hongo en el suelo. Ello sería una característica importante para la selección de *Trichoderma* especies que podrían ser utilizadas en el control biológico.

Contra la mayoría de productos químicos que en la práctica se utilizan para los tratamientos de semilla y asperciones foliares, demostró ser *Trichoderma* spp. tolerante. La resistencia contra algunos fungicidas podría ser una alternativa para su uso en combinación con productos químicos en sistemas integrados de control.

La efectividad de *Trichoderma* spp. no debe ser vista solamente por su capacidad antagonista contra los hongos patógenos, sino también por su capacidad de inducir el crecimiento en las plantas y posiblemente la facultad de activar una resistencia natural contra el ataque de los patógenos.

### 7.3 Phytotoxicidad de BION<sup>®</sup> WG 50 y BION<sup>®</sup> 100 EC

El grado de efecto de BION<sup>®</sup> varía de acuerdo a la concentración, del tipo de planta y del método de aplicación. BION<sup>®</sup> WG 50 en concentraciones de 20 y 40 µg/ml durante un tratamiento de remojo de 1 a 4 horas no produce efectos fitotóxicos. Aplicaciones de BION<sup>®</sup> en la parte foliar de las plántulas de fréjol, con 20 µg/ml, en garbanzo con 5 µg/ml, en lenteja con 10 µg/ml y en Guisantes hasta 40 µg/ml producen efectos positivos en el crecimiento. Aplicaciones al suelo de BION<sup>®</sup> pueden ser transportadas a través de las raíces a las hojas, pero debido a la gran cantidad utilizada, económicamente no es rentable.

BTH 100 EC en concentraciones de 12,5 µg/ml y con tratamientos de 1 a 4 horas no afecta a la germinación ni a la altura de las plantas, pero dosis sobre 25 µg/ml conducen a un crecimiento depresivo de las plantas.

### 7.4 Aktivación de Resistencia gegen *C. rolfsii*

La efectividad del inductor de resistencia BION<sup>®</sup> WG 50 und BION<sup>®</sup> 100 EC para provocar la activación de los mecanismos de defensa naturales de las plantas contra *C. rolfsii*, depende

de la concentración del inóculo, del tipo de inóculo así como de la distancia que exista entre el inóculo del patógeno con las semillas.

En inoculaciones con esclerotios de *C. rolf sii*, pudieron emerger las plántulas, las mismas que fueron aplicadas con dosis de 10 y 20 20 µg/ml BION<sup>®</sup> WG 50. Aquí se produjo una activación sistémica de resistencia. El uso del inductor condujo a una reducción del número de frutos, pero elevó el peso. *C. rolf sii* mediante un restante de inokulo puede nuevamente atacar las plantas y llevar a una cosecha limitada.

El efecto de la resistencia activada (SAR) puede ser influenciada por factores como temperatura, dosis, método de aplicación del inductor así como del tipo de planta y del tipo de patógeno.

En la mayoría de los ensayos, en los cuales las semillas fueron inoculadas con mijo como portadores del inóculo de *C. rolf sii*, no hubo germinación de plántulas y por ende tampoco una activación de resistencia. De esa manera se supone que la efectividad para activar los mecanismos de defensa de las plantas depende de la velocidad de invasión del patógeno así como de la rapidez con que las plantas puedan formar las barreras físicas y químicas de defensa.

Finalmente se puede deducir, que *Trichoderma* spp. como un agente de control biológico y BION<sup>®</sup> como un inductor de resistencia de las plantas pueden ser utilizados exitosamente en métodos de control de numerosas enfermedades. El uso de *Trichoderma* spp. ante todo puede ser aplicado durante el período crítico de infección de las plantas y proteger del ataque de los hongos del suelo y BION<sup>®</sup> contra las enfermedades foliares. Debido a su baja toxicidad para el medio ambiente tanto *Trichoderma* spp. como BION<sup>®</sup> representan una alternativa al uso de fungicidas.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABADA, K.A. (1994): Fungi caused damping-off and root rot on sugar-beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*. Agriculture, Ecosystems and Environment 51: 333-337.
- ADAMS, P.B. & WONG, J.A.-L. (1991): The effect of chemical pesticides on the infection on Sclerotia of *Sclerotinia minor* by the biocontrol agent *Sporidesmium sclerotivorum*. Phytopathology 81: 1340-1343.
- AGNIHORI, V., SEN, C. & SRIVASTAVA, S. 1975. Role of fungitoxicants in the control of *Sclerotium* rot of sugarbeet, *Beta vulgaris* L. Indian J. Exp. Bio. 13:89-91.
- AGRIOS, G.: Plant Pathology. Fourth Edition. S. 64-82, 93-113, 145, 207-215, 253, 359, 389-390, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1997.
- ALEXANDER, D., GOODMAN, R.M., GUT-RELLA, M., GLASCOCK, C. & WEYMANN, K. (1993): Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein-1a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7327-7331.
- ALTOMARE, C., VORVELL, W.A., BJÖRKMAN, T. & HARMAN, G.E. (1999): Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1295-22.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. (1987a): Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of Rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77: 358-362.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. (1987b): Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77: 182-189.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. (1988): Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. Canadian Journal of Microbiology 34: 694-696.
- ALSTRÖM, S. (1991): Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere *Pseudomonas*. J. Gen. Appl. Microbiol. 37:495-501.
- ANFOKA, G. & BUCHENAUER, H. (1997): Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. Physiol. Mol. Plant Pathol. 50: 85-101.
- ANONYMUS. (1996): Plant Activator: Nature created the concept. Ciba-Geigy. S. 1-36.
- ARTIGUES, D. & DAVET, P. (1984): Activités  $\beta$  (1-3) glucanasiques et chitinasiques de quelques champignons, en relation avec leur aptitude à détruire les sclérotés de *Corticium rolfsii* dans de la terre stérile Soil Biology & Biochemistry 16: 527-528.

- AUST, H., BUCHENAUER, H., KLINGAUF, F., NIEMANN, P., PÖHLING, H.M., & SCHÖNBECK, F. (1991): Glossar Phytomedizinischer Begriffe. Schrittenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Band 3. S. 123.
- AYCOCK, R. (1966): Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. N.C. Agr. Exp. Sta Tech. Bull. 17, 202.
- BACKMAN, A. & PORTER, M. (1990): Compendium of Peanuts Diseases. The American Phytopathology Society, Second Edition, St. Paul, Minnesota, S. 17-18.
- BAKER, R. (1989): Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. Trends in Biotechnology 7: 34-38.
- BARAK, R., ELAD, Y., & CHET, I. (1984): Lectins: A possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* und *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 75: 458-462.
- BARNETT, C.C., BERKA, R.M. & FOWLER, T. (1991): Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma viride*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. Bio/Technologies 9: 562-567.
- BEDLAN, D., (1988): Der Einsatz von *Trichoderma viride* Pers. gegen *Rhizoctonia solani* Kühn an Salat in Freiland. Pflanzenschutzberichte 49, 27-33.
- BEDLAN, G. 1988. Wirkung einiger Fungizide gegen *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. Bundesanstalt für Pflanzenschutz, 4: 2-3.
- BELL, D. K., WELLS, H. D., & MARKHAM, C.R. (1982): In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.
- BENHAMOU, N. & CHET, I. (1993): Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83: 1062-1071.
- BENHAMOU, N. (1995): Immunocytochemistry of plant defense mechanisms induced upon microbial attack. Microsc. Res. Tech. 31: 63-78.
- BENHAMOU, N. & CHET, I. (1996): Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology 86: 405-416.
- BEYRL, H. (1995): The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In A. Varma and B. Hock (ed). Micorrhiza. Springer-Verlag KG. Berlin. S. 365-391.
- BISBYS, G.R. (1939): *Trichoderma viride* Per. Ex Fr. and notes on Hypocrea. Br. mycol. Soc. 23: 149-168.
- BISSETT, J. (1984): A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. Nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.



- BISSETT, J. (1991a): A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.
- BISSETT, J. (1991b): A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
- BLAKEMAN, J.P.: Competitive antagonism of air-borne fungal pathogens. In Fungi in biological control systems. S. 141-160, Edited by M.N. Burge, St. Martin's Press, Manchester, 1988.
- BOL, J.F., LINTHORS, H.T.M. & CORNELISSEN, B.J.C. (1990): Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 28:113-38.
- BÖRNER, H. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 7., neubearb. Aufl., 77, 81, 93, 150, 169, 187 - Stuttgart: Ulmer, 1997.
- BRANCH, W (1987): Evaluation of Peanuts Cultivars for Resistance to Field Infection by *Sclerotium rolfsii* Sacc., Pl. Dis. 71: 268-270.
- BUCHENAUER, H. (1984): Resistenzentwicklung von Pilzen gegenüber Fungiziden und Strategien zur Vermeidung von Fungizidresistenz. Ges. Pflanzen 36: 132-142.
- BUCHENAUER, H. (1998): Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. Journal of plant diseases and protection, 105, (4): 329-348.
- BUCHERT, J., RANUA, M., SIIKA-AHO, M., PERE, J. & VIKARI, J. (1994): *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 941-945.
- BURGE, M.N. ( 1988): The scope of fungi in biological control. In Fungi in biological control systems. Edited by M.N. Burge. St. Martin's Press, S. 1-18.
- BURGES, D.R., BRETAG, T., & KEANE, P.J. ( 1997): Biocontrol of seedborne *Botrytis cinerea* in chickpea with *Gliocladium roseum*. Plant Pathology 46: 298-305.
- BURNS, J. & BENSON, D. (2000): Biocontrol of Damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Thichoderma viride* and binucleate Rhizoctonia fungi. Pl. Dis. 84: 644-648.
- CAMERON, R.K. (2000): Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know?. Physiological and Molecular Plant Pathology 56: 91-93.
- CAMPBELL, M. & ELLIS, E. (1992): Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. Phytochemistry 31:737-742.
- CAMPOROTA, P., BORDEI, V. & RICHARD-MOLARD, M. 1988: Lutte biologique contre *Polymixa betae* (Kestn) au moyen de *Trichoderma* sp. Résultats préliminaires *in vivo*. Agronomie 8 (3), 223-225.
- CARVER, C. E., PITT, D., & RHODES, J. (1996): Aetiology and biological control of Fusarium wilt of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. Plant Pathology 45: 618-630.

- CENTURY, K.S., HOLUB, E.B. & STASKAWICZ, B.J. (1995): NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6597-6601.
- CHANG, Y.C., CHANG, Y.C., R. BAKER., O. KLEIFELD. & CHET I. (1986): Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Pl. Dis.* 70:145-148.
- CHERIF, M., & BENHAMOU, N. (1990): Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80: 1406-1414 .
- CHESTER, K.S. (1933): The problem of acquired physiologicval immunity in plants. *Q. Rev. Biol.* 8: 275-324.
- CHET, I. (1987): *Trichoderma*-aplication, mode of action, and potencial as biocontrol agent of soilborne plant patogenic fungi, S.137-160.
- CHET, I. & INBAR, J. 1994): Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 37-43.
- CHET, I., BENHAUMOU, N., & HARAN, S (1998): Mycoparasitism and lytic enzymes. In *Trichoderma* ans *Gliocladium*. Edited by C.P. Kubicek and G.E. Harman, Vol. 2. Londres.
- CIAT: Problemas en el cultivo del frejol. Colombia, S.5, 1981.
- COHEN, Y. & KUC, J. (1981): Evaluation of systemic acquired resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora hyoscyani* f.sp. *tabacina*. *Phytopathology* 71:783-87.
- COLE, J. & ZVENYIKA, Z, (1988): Integrated control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tobacco transplants with *Trichoderma harzianum* and triadimenol. *Plant Pathology* 37, 271-277.
- COLE-KANKS, E.S., & DEVERALL, B.J. (2000): Effect of 2,6-dichloroisonicotinic acid, ist formulation materials and benztiaadiazole on systemich resistance to alternaria leaf spot in cotton. *Plant Pathology* 49: 171-170.
- CONWAY K.E. (1986): Use of fluid-drilling gels to deliver biological control agents to soil. *Plant Disease* 70: 835-839.
- COOK, R.J. (1997): Biological control of soilborne plant pathogens: Past Present, and future. *International Symposium Clean Agriculture*, Sapporo, Japan, S. 35-48.
- COOK, R.J. & ROVIRA, A.D. ( 1976): The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biol. Biochem.* 8: 269-273.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. (1983): The Nature and Practice of Biological Control of Pathogens. St. Paul, Minn: Am. Phytopathol. Soc. S. 539.

- CURL, W.A., & HANDSEN, J.D. (1964): The microflora of natural sclerotia of *Sclerotium rolfii* and some effects upon the pathogen. Plant Disease Reporter 48: 446-450.
- DALISAY, R. & KUC, J. (1995): Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 47:315-327.
- DANN E.K. & DEVERALL, B.J. (2000): Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. Plant Pathology 49: 324-332.
- DANIELSON, R. M. & DAVEY, C. B. (1973): The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. Soil Biol. Biochem. 5, 485-494.
- DEB, P, DUTTA, K. (1990): Studies on biological Control of foot rot disease of Soybean caused by *Sclerotium rolfii* Sacc. Z. PflKrankh. PflSchutz, 98, 539-546.
- DE LA CRUZ, J., HIDALGO-GALLEGO, A., LORA, J.M., BENITEZ, T., PINTOR-TORO, J.A., & LLOBELL, A. (1992): Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Biochem. 206: 859-867.
- DE LA CRUZ, J., PINTOR-TORO, J.A., BENITEZ, T. & LLOBELL, A. (1995): Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. J. Bacteriol. 177: 1864-1871.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. (1971a): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. mycol. Soc. 57: 25-39.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. (1971b): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 41-48.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. (1971c): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions.- Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 363-369.
- D'ERCOLE, N., SPORTELLI, M., & NIPOTI, P. (1984): Differenti tipi di antagonismo die *Trichoderma* spp. nei confronti di miceti fitopatogeni del terreno. Informatore Fitopatologico 34: 43-47.
- DHILLION, S. (1993): Effect of *Trichoderma harzianum*, *Beijerinckia mobilis* and *Aspergillus niger* on arbuscular mycorrhizal infection and sporulation in maize, wheat, millet, sorghum, barley, and oats. Z. PflKrankh. PflSchutz. 101 (3), 272-277.
- DI PRIETO, A, LORITO, M, HAYES, C, BROADWAY, R, HARMAN, G. (1992): Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, Characterization, and Synergistic Antifungal Activity in Combination with Gliotoxin. Phytopathology 83: 308-313.
- DIOMANDE, M. & BUETE, M. 1977 Comparison of soil plate fungicide screening and field efficacy in control of *Sclerotium rolfii* on peanuts. Pl. Dis. Rep. 61:408-412.

- DUBOS, B., JAILOUX, F. & BULIT, J. (1982): Protection du vignole contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. Colloques de l'INPA 11: 205-219.
- DUBOURDIEU, D., DESPLANQUES, C., VILLETAZ, J.C., & RIBEREAU-GAYION, P. (1985): Investigations of an industrial  $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Carbohydrates Research 144: 277-287.
- DUMAS, E., BIGIRIMANA, Y., FURLAN, V. & ASSELIN, A. (1984): Chitinase, chitosanase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. Plant Sci. 84:17-24.
- DURNER, J., SHAH, J., KLESSIG, D. (1997): Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends in Plant Science, Vol. 2: 266-274.
- EASTBURNE, D.M. & BUTLER, E.E. (1991): Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. Mycologia 83: 257-263.
- EDEN, M. A., HILL, R. A. & STEWARD, A. (1996): Biological control of *Botrytis cinerea* stem infection of greenhouse tomatoes. Plant Pathology 45: 276-284.
- ELAD, Y., CHET, I., & KATAN, J. (1980): *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 119-121.
- ELAD, Y., CHET, I., & HENIS, Y. (1981): Biological control of *Rhizoctonia solani* in Strawberry fields by *Trichoderma harzianum*. Plant and Soil 60: 245-254.
- ELAD, Y., CHET, I. & HENIS, Y. (1982): Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28: 719-725.
- ELAD, Y., CHET, I., BOYLE, P. & HENIS, Y. (1983): Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73: 85-88.
- ELAD, Y., BARAK, R. & CHET, I. (1984): Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biol. Biochem. 16: 381-386.
- ELAD, Y. (1988b): Involvement of ethylene in the pathogenicity of *Botrytis cinerea* Pers. on rose and carnation flowers and the possibility of control. Ann. Appl. Biol. 113, 589-598.
- ELAD, Y., KIRSHNER, B., & Y. GOTTLIEB (1993): Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and postharvest treatments with biological and chemical agents. Crop Protect. 12, 69-73.
- ELAD, Y., O'NEILL, T., COHEN, A. & SHTIENBERG, D.: Factors influencing control of gray mold by means of Trichodex (*Trichoderma harzianum* T39) under field conditions. Fifth International *Trichoderma* and *Gliocladium* workshop. Beltsville, 1995.

- ELAD, Y. & SHTIENBERG, D. (1996): *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. Adv. Biol. Control. S. 310-319.
- ELAD, Y., ZIMAND, G., ZAQS, Y., ZURIEL, S. & CHET, I. (1996): Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathology. 42:324-332.
- ELSTNER, E.F., OBWALD, W. & SCHNEIDER, I. (1996): Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 1-10, 95, 170-173, 216-223- 238-244.
- ENEBACK, S.A., & CAREY, W.A. (2000): Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. Plant Dis. 84: 306-308.
- FANELLI, C & CERVONE, F. (1977): Polygalacturonase and cellulase production by *Trichoderma koningii* and *Trichoderma pseudokoningii*. Trans. Br. mycol. Soc. 68: 291-294.
- FAULL, J.L. (1988): Competitive antagonism of soil-borne plant pathogens. In Fungi in biological control systems. Edited by M.N. Burge. St. Martin's Press, S. 125-140.
- FRAVEL, D.R., MAROIS, J.J., LUMSDEN, R.D. & CONNICK, W.J. (1985): Encapsulation of potential agents in an Alginate-Clay Matrix. Phytopathology 75: 774-777.
- FRAVEL, D.R. (1988): Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 75-91.
- FRITSCH, W.: Mikrobiologie. 2. Überarbeitete Auflage. S. 164, 284, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1999.
- GAMS, W. & DOMSCH, K. (1980): Compendium of soil fungi. A. P., London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 795-809.
- GAMS, W., VAN DER AAR, H.A., VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J., SAMSON, R.A. & STALPERS, J.A. (1987): CBS course of mycology. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- GARRETT, S.D. (1970): Pathogenic Root-Infecting Fungi. Cambridge University Press. London. S. 294-295.
- GASONI, L., COZZI, J. & KOBAYASHI, (1998): Die Wirkung verschiedener Formulierungen auf die Überlebensrate antagonistischer Bakterien und auf deren Fähigkeit, die von *Rhizoctonia solani* verursachte Umfallkrankheit von Rettich zu vermeiden. Z. Pflkrank. Pflschutz 105: 41-48.
- GAZAWAY, W, HOGAN, A. (1989): Compendium of Soybean Diseases, 3<sup>rd</sup>. ed. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, S. 48-49.

- GÄUMANN, E. (1946): Pflanzliche Infektionslehre. Basel: S. 611. In STICHER, L., MAUCH-MANI, B. MÉTRAUX, J.P. (1997): Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 235-270.
- GHISALBERTI, L. & SIVASITHAMPARAM, K. (1991): Anti fungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 23:1011-1020.
- GHISALBERTI, E. & ROWLAND, C. (1993): Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products, 56: 1799-1804.
- GILMAN, J.C. & ABBOTT, E.V. (1927): A summary of the soil fungi. Iowa St. Coll. J. Sci. 1: 225-343.
- GINDRAT, D., E. VAN DER HOEVEN & MOODY, A.R. 1983: Control of *Phomopsis sclerotioides* with *Gliogladium roseum* or *Trichoderma*. Neth. J. Pl. 83 (1), 429-438.
- GODTFREDSEN, W.O. & VANGEDAL, S. (1965): Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. Acta Chem. Scand. 19: 1088-1120.
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K-H., OOSTENDORP, S., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. & RYALS, J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8:629-643.
- GRAU, C. (1989): Compendium of Soybean Diseases. Compendium of Soybean Diseases, 3<sup>rd</sup>. ed. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, S. 47.
- GRESSEL, J.B. & HARTMANN, K.M. (1968): Morphogenesis in *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. Planta 79: 271-274.
- GRICHAR, W. J. (1995): Management of stem rot of peanuts (*Arachis hypochea*) caused by *Sclerotium rolfsii* with fungicides. Crop Protection 14: 111-115.
- GRISON, R., CREZES-BESSET, B., SCHNEIDER, M., LUCANTE, N. & OLSEN, L. (1996): Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. Nat. Biotechnol. 14:643-646.
- GRONDONA, I., PEREZ, DE ALGABA, A., MONTE, E & GARCIA-ACHA, I. (1992): Biological control of sugar beet diseases caused by *Phoma betae*. Greenhouse and field test. International Organization for Biological Control. S. 39-41.
- GHISALBERTI, E.L. & SIVASITHAMPARAM, K.(1991): Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil. Biol. Biochem. 23: 1011-1020.
- GUIZZARDI, M., CACCIONI, D.R.L., & PRATELLA, G.C. (1994): Resistance monitoring of *Monilia laxa* (Aderh. Et Ruhl.) Honey to benzimidazoles and dicarboxides in postharvest stage. J. Pl. Dis. Protect. 102: 86-90.

- GULLINO M.L. & GARIBALDI, A. (1988): Biological and integrated control of grey mould of grapevine: results in Italy. Bulletin 18: 9-12. In ELAD, Y., KIRSHNER, B., & Y. GOTLIB (1993): Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and postharvest treatments with biological and chemical agents. Crop Protect. 12: 69-73.
- GURKING R. JENKINS. 1985. Influence of cultural practices, fungicides, and inoculum placement on southern blight and *Rhizoctonia* crown rot of carrot. Pl. Dis. 69:477-481.
- HADAR, J., CHET, I., & HENIS, Y. 1978: Biological control of *Rhizoctonia solani* Damping-Off with Wheat Bran Culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64-68.
- HADAR, Y., HARMAN, G.E. & TAYLOR, A.G. (1984): Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. Phytopathology 74, 106-110.
- HALL, R. STEADMAN, S.R. (1991): Compendium of Bean Diseases. Second Edition. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, S. 5, 28.
- HAMMERSCHMIDT, R. & KUC, J. (1995): Induced Resistance to Disease in Plants. Dordrecht: Kluwer. S. 182. In STICHER, L., MAUCH-MANI, B. MÉTRAUX, J.P. (1997): Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 235-270.
- HAN, D.Y., COPLIN, D.L., BAUER, W.D. & HOITINK, H.A.J. (2000): A rapid bioassay for screening Rhizosphere Microorganisms for their ability to induce systemic resistance. Phytopathology, Vol. 90, 4: 327-332.
- HARAN, S., SCHICKLER, H., PE'ER, S., LOGEMANN, S., OPPENHEIM, A. & CHET, I. (1993): Increased constitutive chitinase activity in transformed *Trichoderma harzianum*. Biological Control 3: 101-108.
- HARAN, S., Schickler, H., Oppenheim, A. & Chet, I. (1995): New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycol. Res. 99: 441-446.
- HARAN, S., SCHICKLER, A. & CHET, I. (1996): Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology 86:980-985.
- HARMAN, G. E., CHET, I., & BAKER, R. (1980): *Trichoderma hamatum* on seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:1107-1172.
- HARMAN, G. E., CHET, I. & BAKER, R. (1981): Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biological control agent. Phytopathology 71: 569-572.
- HARMAN, G., JIN, X., STASZ, T., PERUZZOTTI, G., LEOPOLD, A. & TAYLOR, A.G. (1991): Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. Biol. Control 1: 23-28.
- HARMAN, G., HAYES, C., LORITO, M., BROADWAY, R., DI, P., PETERBAUER, C. & TRONSMO, A. (1993): Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83:313-318.

- HARMAN, G.E., & NELSON, E.B. (1994): Mechanism of protection of seed and seedlings by biological control treatments: Implications for practical disease control. British Crop Protection Council, 283-292.
- HARMAN, G.E., KOVACH, J., LATORRE, B., AGOSIN, E., SAN MARTIN, R., RIEGEL, D.G., TRONSMO, A. & PEARSON, R. C. (1995): Integrated and biocontrol of *Botrytis* on grape and strawberry. Fifth International *Gliocladium* and *Trichoderma*. Beltsville.
- HARMAN, G. & BJORKMAN, T. (1998): Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement, p. 229-225.
- HARTLEB, H., HEITEFUSS, R. & HOPPE, H.H. (1997): Resistance of crop plants against fungi. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, S. 26, 42, 84-97, 161-167, 218-223.
- HAYES, C.K., BJORKMAN, T. & HARMAN, G.E. (1997): Results of Fields trials a commercial biofungicide. Phytopathology 87, S. 40.
- HEITEFUß, R.: Pflanzenschutz. Grundlagen der praktischen Phytomedizin. Zweite neue Auflage, 119-145. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1987.
- HEITEFUß, R.: Pflanzenschutz. Grundlagen der praktischen Phytomedizin. Dritte. Neue Auflage, 136-155. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2000.
- HENIS, A., GHAFAR, A. & R. BAKER, (1977): Integrated control of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Radish: Effect of Successive Plantings. PCNB, and *Trichoderma harzianum* on Pathogen and Disease. Phytopathology 68, 900-907.
- HENIS., Y. & PAPAVIDAS, G. (1983): Factors affecting germinability to attack of sclerotia of *Sclerotium solfsii* by *Trichoderma harzianum* in Field Soil.
- HO W.C. & KO W.H. (1985): Soil microbiostasis: effects of environmental and edaphic factors. Soil Biology & Biochemistry 17:167-170.
- HOCK, B., FEDKE, C. & SCHMIDT, R.: Herbizide: Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen, 15-19, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
- HOFFMANN, W., MUDRA, A. & PLARRE, W.: Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. 2. Auflage, 123-124, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1985.
- HORNBY, D. (1983): Suppressive soils. Ann. Rev. of Phytopathology 21: 65-85.
- HOWIE, W.J, COOK, R.J., & WELLER, D.M. (1987): Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonas suppressive to take all. Phytopathology 77: 286-292.
- HOSSAIN, I. & SCHLÖSSER, E. (1993): Advantage of using Prochloraz over Benomyl in controlling *Pseudocercospora herpotrichoides*. Crop. Res. 6: 120-125.



- HUANG, Q., TEZUKA, Y., KIKUCHI, T., NISHI, A., TUBAKI, K & TANAKA, K. (1995): Studies on metabolites of microparasitic fungi. II. Metabolites of *Trichoderma koningii*. Chem. Pharm. Bull. 43: 223-229.
- HUBER, D.M. & SCHNEIDER, R.W. (1982): The description and occurrence of suppressive soils. In Suppressive soils and plant disease. Edited by Scheneider R.W. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1-7.
- HUNT, M.D. & RYALS, J.A. (1996): Systemic acquired resistance signal transduction. Crit. Rev. Plant Sci. 15: 583-606.
- IMBAR, J. & CHET, I. (1992): Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. J. Bacteriol. 174: 1055-1059.
- INBAR, J., ABRAMSKY, M., COHEN, D. & CHET, I. (1994): Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. Eur. J. Plant Pathol. 100: 337-346.
- INBAR, J. & CHET, I. (1997): Lectins and biocontrol. Crit. Rev. Biotechnol. 17: 1-20.
- INBAR, M., DOOSTDAR, H., SONODA, R.M., LEIBEE, G.L., & MAYER, R.T. (1998): Elicitors of plants defensive systems reduce insect densities and disease incidence. J. of Chem. Ecol. 24: 135-149.
- JACKSON, M. (1997): Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. Trends in Plant Science, 2: 22-28.
- JALEED, S. & BAKER, R. (1986): Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77: 182-189.
- JENKINGS & AVERRE (1986):. Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. Plant Disease 70, 614-619.
- JEUN ,Y.C., SIEGRIST, S. & BUCHENAUER, H. (2000): Biochemical and cytological studies on mechanisms of systematically induced resistance to *Phytophthora infestans* in tomato plants. J. Phytopathol. 148: 129-140.
- JIN, X., HARMAN, E. & TAYLOR, A. (1991): Conidial Biomass and Desiccation of *Trichoderma harzianum* Produced at Different Medium Water Potentials. Biolog. Control 1: 237-243.
- JONES, R.W. & HANCOCK, J.G. (1988): Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. J. Gen. Microbiol. 134: 2067-2075.
- JONES, J.B., JONES, J.P., STALL, R.E. & ZITTER, T.A.: Compendium of Tomatoes Diseases: Diseases caused by fungi, 9-25. The American Phytopathology Society, Second Edition, St. Paul, Minnesota, 1991.
- KHAN, M.R. & GUPTA, J. (1998): Antagonistic efficacy of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina* on eggplant. J. Pl. Dis. Protect.

- KATAN, J. (1981): Solar heating (solarisation) of soil for control of soil-borne pest. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 211-236.
- KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T. & HERZOG, J. (1994): Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439-59.
- KIRSTIN, W., LABBE, C., BENHAMOU, N. & BELANGE, R. (1999): Effects of milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* 89:728-736.
- KLEIFELD, O. & CHET, I. (1992): *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144:267-272.
- KNOESTER, M., PIETERSE, C., BOL, J.F. & VAN LONN L.C. (1999): Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by Rhizobakteria requires Ethylene-depennt signaling at the site of application. *MPMI* 12: 720-727.
- KNOK, O., FAHY, P., HOITINK, A., & KUTER, G. 1987: Interactions between bacteria and *Trichoderma* in supression of *Rhizoctonia solani* Damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77:1206-1212.
- KOCH, E., KEMPF, H.-J. & HESSENMÜLLER, A. (1998): Charakterisierung der Biokontrolle und Evalierung potentiell pflanzenwuchsfördernder Eigenschaften ausgewählter Rhizobakterien. *Z. PflKrankh. PflSchutz* 105: 567-580.
- KNUDSEN , G.R. & BIN LI. (1990): Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology* 80: 724-727.
- KNUDSEN, G.R. & ESCHEN, D J. (1991): Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 75: 466-470.
- KÖHL, J. (1988): Eignung von Stämmen aus der Gattung *Trichoderma* für die biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze. Diss. Giessen, 1989.
- KÖHL, J. & SCHLÖSSER, E. (1988): Specifity in decay of Sclerotia of *Botrytis cinerea* by species ans strains of *Trichoderma*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 53, 339-346.
- KÖHL, J. & SCHLÖSSER, E. (1988): Occurence and temperature requirements of four *Trichoderma* species from different Regions and Substrates. *Angew. Botanik* 62: 301-309.
- KÖHL, J., & SCHLÖSSER, E. (1989a): Effect of *Trichoderma* spp. on seddlings of sugar beet during the biological control of pathogens. *Med. fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 54, 707-715.
- KÖHL, J. & SCHLÖSSER, E. (1989b): Decay of Sclerotia of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp. at Low Temperatures. *J. Phytopathology* 125: 320-326.

- KÖHL, J. & SCHLÖSSER, E. (1989c): Effect of two *Trichoderma* spp. on the infection of maize roots by vesicular-arbuscular mycorrhiza. Z. PflKrankh. PflSchutz. 96: 439-443.
- KÖHL, J., & SCHLÖSSER, E.: Antagonism against *Rhizoctonia solani* and cellulolytic activity of strains of *Trichoderma*. Biotic Interactions and Soil-Borne Diseases, 160-164 Amsterdam, Elsevier, 1991.
- KRANZ, J.: Epidemiologie der Pflanzenkrankheiten: Eine Einführung in Grundlagen, Methoden und praktische Anwendung, 24-98, Ulmer Verlag, 1996.
- KRANZ, J, SCHMUTTERER, H, WERNER, K.: Krankheiten, Schädlinge und Unkräuter im tropischen Pflanzenbau. Parey. Verlag Berlin S.143, 153, 1979.
- KRANZ, J, SCHMUTTERER, H, WERNER, K.: Enfermedades, Plagas y Malezas de los Cultivos Tropicales, S. 79, Parey Verlag Berlin, 1982.
- KUBICEK, C.P. (1992): The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 45: 1-45.
- KUHLS, K. (1997): Anwendung und Bewertung DNA-analytischer Methoden zur Lösung taxonomisch-phylogenetischer Fragestellungen bei filamentösen Pilzen am Beispiel der Gattung *Trichoderma*. Akademischer Abhandlungen zur Biologie, S. 35
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., MEYER, W., KUBICEK, C.P. & BÖRNER, T. (1997): Revision of *Trichoderma* sec. Longibrachiatum including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Mycologia 89: 442-460.
- KUROSAKI, F., AMIN, M. & NISHI, A. (1986): Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. Physiol. Mol. Plant Pathol. 28:359-370.
- LATUNDE-DADA, O. (1993): Biological control of southern blight disease of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* with simplified mycelial formulations of *Trichoderma koningii*. Plant Pathology 42, 522-529.
- LAWTON, K., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WYEMANN, K., DELANEY, T., KESSMAN, H., STAUB, T. & RYALS, J. (1996): Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J. 10:71-82.
- LEDERER, W., LORENZ, K.H. & SEEMÜLLER, E. (1992): Studies on antagonistic effects of *Trichoderma* Isolates Against *Phytophthora cactorum*. J. Phytopathol. 136: 154-164.
- LEE, Y., W. WU. (1986): Chemical und biological controls of sunflower *Sclerotinia* disease. Plant Prot. Bull. 28: 101-109.
- LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. (1983): Production of chlamidospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. Soil Biol. Biochem. 15: 351-357.

- LEWIS J.A. & PAPAVIDAS, G.C. (1985): Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. *P. Pathol.* 34: 571-577.
- LEWIS J.A. & PAPAVIDAS, G.C. (1984): A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* spp. and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* 74:1240-1244.
- LEWIS, J. & PAPAVIDAS, G. (1987a): Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *P. Pathol.* 36: 438-445.
- LEWIS J.A. & PAPAVIDAS, G.C. (1987b): Permeability changes in hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Phytopathology* 77: 699-703.
- LEWIS, J., LUMSDEN, R. & LOCKE, J. (1996): Biocontrol of damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with alginate prills of *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum* and various food basis. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 163-173.
- LIFSHITZ, R., WINDHAM, M. & BAKER, R. (1986): Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76, 720-725.
- LIN, A., LEE, T.-M. & RERN, J.C. (1994): Tricholin, a new antifungal agent from *Trichoderma viride*, and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. *J. Antibiotics* 47: 799-805.
- LIU, S. & BAKER, R. (1980): Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 404-412.
- LIU, L., KLOPPER, J.W. & TUZUN, S. (1995): Induction of systemic acquired resistance in cucumber by plant growth-promoting bacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.
- LO, C.T. (1996): Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 80: 736-741.
- LO, A., NELSON, E., HAYES, C. & HARMAN, G. (1997): Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88: 129-136.
- LOCKWOOD, J.L. (1977): Fungistasis in soil. *Biological Reviews*, 52: 1-43.
- LORITO M., HARMAN, D.E., HAYES, C.K., BROADWAY, R.M., TRONSMO, A., & DI PIETRO (1993): Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinobiosidase. *Phytopathology* 83:302-307.
- LORITO, M., HAYES, C.K., DI PIETRO, A. & WOO, S.L. (1994): Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma harzianum*: *Phytopathology* 84: 398-405.

- LORITO, M., PETERBAUER, C., HAYES, C.K. & HARMAN, G.E. (1994): Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140: 623-629.
- LORITO, M., FARKAS, V., REBUFFAT, S., BODO, B. & KUBICEK, C.P. (1996): Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178: 6382-6385.
- LORITO, M., GARCIA, I., WOO, S.L., COLUCCI, G., HARMAN, G.E., PINTOR-TORO, J.A., FILIPPONE, E., MUCCIFFORA, S. & SCALA, F.: Genes from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1998.
- LYON, G.D. & NEWTON, A.C. (2000): Do resistances elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? *Plant Pathology* 46: 636-641.
- LUMSDEN, R.D. & LOCKE, J.C. (1989): Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soils mix. *Phytopathology* 79: 361-366.
- MALAMY, J., HENNIG, J. & KLESSIG, D.F. (1992): Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugate during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4:359-366.
- MANZALI, D., NPOTI, P., FLIPPINI, G., D'ERCOLE, E. (1993): Scanning electron microscopy study of *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. strains against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Phytopath. medit.* 32: 1-6.
- MAUCH, F., MAUCH-MANI, B. & BOLLER, T. (1988): Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *P. Physiol.* 88:936-942.
- MC CARTER, S., JAWORSKI, C., JOHNSON, A. & WILLIAMSON, R. (1976): Efficacy of soil fumigants and methods of application for controlling southern blight of tomatoes grown for transplants. *Phytopathology* 66:910-913.
- MC CARTER, S.: *Compendium of Tomato Diseases*. Third Edition, 48-49, The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, 1993.
- MELO, I.S., FAULL, J.L., & GRAEME-COOK, K.A. (1997): A relationship between *in vitro* cellulase production of uv-induced mutants of *Trichoderma harzianum* and their bean rhizosphere competence. *Mycological Research*, 101: 1389-1392.
- MEINERT, G. & MITTNACHT, A.: *Integrierter Pflanzenschutz: Unkräuter, Krankheiten und Schädlinge im Ackerbau*, 14-48, Ulmer Verlag, Stuttgart, 1992.
- MENGEL, K.: *Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze*, 7. Auflage, 360-373, Gustav Fischer Verlag Jena, 1991.
- MENZIES, J.G. (1993): A strain of *Trichoderma viride* pathogenic to germinating seedlings of Cucumber, Pepper, and Tomato. *Research Station, Agriculture Canada* 42: 784-791.

- MENZIES, J. & BELANGER, R. (1996): Recent advances in cultural management of diseases of greenhouse crops. *Can. J. Plant. Pathol.* 18:186-193.
- METRAUX, J.P., AHL-GOY, P., STAUB, T. & SPEICH, J. (1991): Induced resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1:432-439.
- MEYER, C.E. (1966): U-21.963, a new antibiotic. 2. Isolation and characterization. *Appl. Microbiol.* 14: 511-512.
- MEYER, E., EMSCHERMANN, F., FRAHM, J., GEBEL, D., HÄNISCH, D., KLUG, M., KNOTT, L., KOCK, T., MEINERT, G. & SCHRUF, G.: Taschenbuch des Pflanzenarztes. 50. Folge, S. 218-219, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup, 2001.
- MEYER, R.J. & PLASKOWITZ, J.S. (1989): Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. *Mycologia* 81: 312-317.
- MEYER, R., MORAWETZ, R., BÖRNER, T. & KUBICEK, C.P. (1992): The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma* aggregate. *Curr. Genet.* 21: 27-30.
- MEYER, R. (1991): Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2269-2276.
- MIHUTA-GRIMM, L., & R.C. ROWE, (1985): *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agents of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Radish in Organic Soil and Comparison of Four Delivery Systems. *Phytopathology* 76, 306-312.
- MINTON, N.A., CSINOS, A.S. & MORGAN, L.W. (1990): Relationship between tillage and nematicide, fungicide, and insecticide treatments on pest and yield of peanuts double-cropped with wheat. *Pl. Dis.* 74: 1025-1029.
- MRINALINI, C. & LATITHAKUMARI, D. (1998): Integration einer verbesserten Wirksamkeit der biologischen Bekämpfung und der Fungizidtoleranz in *Trichoderma* spp. durch Elektrofusion. *Z. PflKrankh. PflSchutz* 105: 34-40.
- MORAWETZ, R., GRUBER, F., MESSNER, R. & KUBICEK, C.P. (1992): Presence, transcription and translation of cellobiohydrolase genes in several *Trichoderma* species. *Curr. Genet.* 21: 31-36.
- MUKHERJEE, P.K., MUKHOPADHYAY, A.N., SARMAH, D.K., & SHRESTHA, S.M. (1995): Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*-its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol. *J. Phytopathology* 143: 275-279.
- MURILLO, I., CAVALLARIN, L., & SAN SEGUNDO, B. (1999): Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* and Immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology* 89: 737-747.
- NASH, F. & GARDNER, G. (1988): Heritability of tomato early blight resistance derived from *Lycopersicon hirsutum* P.I. 126445. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 113:268.

- NEETHLING, D. & NEVALEINEN, H. (1996): Mycoparasitic species of *Trichoderma* produce lectins. Can. J. Microbiol. 42: 141-146.
- NELSON E.B. & HOITIK, A.J. (1983): The role of microorganisms in the suppression of *Rhizoctonia solani* in container media amended with composted hardwood bark. Phytopathology 73: 274-278.
- NELSON E.B. & KUTER, G.A. & HOITIK, A.J. (1983): Effects of fungal antagonist and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. Phytopathology 73: 1457-1462.
- NELSON, M.E. & POWELSON, M.L. (1988): Biological control of grey mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. Plant Dis. 72: 727-729.
- NIDERMAN, T., GENETET, I., BRUYERE, T., GEES, R. & STINTZI, A. (1995): Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Pl. Physiol. 108:17-27.
- NIGAM, P. (1994): Process selection for protein-enrichment: fermentation of the sugar industry byproducts molasses and sugar beet pulp. Process. Biochem. 29: 337-342.
- NULTSCH, W.: Allgemeine Botanik. 10., neubearb. Und erw. Aufl., 12-18, 30, 32, 127,163, 575, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1996.
- ODVODY, G.N. & MADDEN, I D.B. (1983): Leaf sheath blights of *Sorghum bicolor* caused by *Sclerotium roflsii* and *Gloeocercospora sorghi* in South Texas. Phytopathology 74: 264-268.
- OERKE, E., DEHNE, H., SCHÖNBECK, F., WEBER, A. (1994): Crop Production and Crop Protection Estimated losses in major food and cash crops. Elsevier Science B.V., 556-572.
- OKUDA, T., FUGIWARA, A. & FUJIWARA, M. (1982): Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 46: 1811-1822.
- O'NEILL, T.M., ELAD, Y. & SHTIENBERG, D. (1996): Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. Eur. J. Pl. Pathol. 102:635-643.
- ONGENA, M., DAAY, F., JACQUES, P., THONART, P., PAULITZ, T.C. & BÉLENGER, R.R. (2000): Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. Plant Pathology 49: 523-530.
- PACHENARI, A. & DIX, W.J. (1980): Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum* Trans. Br. mycol. Soc. 74: 561-566.
- PAPAVIZAS, G.C., & LUMSDEN, R.D. (1980): Biological control of soilborne fungal propagules. Ann. Rev. Phytopathol., 18: 389-413.
- PAPAVIZAS, G.C. & LUMSDEN, R.D. (1982): Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Pl. Dis. 66, 1019-1020.

- PAPAVIZAS, G.C. (1981): Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology* 71: 121-125.
- PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. (1981): Introduction and augmentation of microbial antagonists for the control of soilborne plant pathogens. In *Biological control in crop protection*. Edited by Papavizas G.C. Beltsville Symposia in Agricultural Research 5, Osmun, 305-322.
- PAPAVIZAS, G. & LEWIS, J. (1982): Evaluation of new Biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capacities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- PAPAVIZAS, G.C., LEWIS, J.A. & ABD-EL MOITY, T.H. (1982): Evaluation of two new types of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. (1983): Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathology* 73: 407-411.
- PAPAVIZAS, G., DUNN, M., LEWIS, J. & BEAGLES-RISTAINO, J. (1984): Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74: 1171-1175.
- PAPAVIZAS, G. (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Phytopathology* 23: 23-54.
- PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. (1989): Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse. *Plant Pathology* 38, 277-286.
- PEDERBY, J.F.: Fungal cell walls- a review. *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*, 5-30, Berlin: Springer Verlag, 1990.
- PENG, G. & SUTTON, C. (1990): Biological methods to control grey mould of strawberry. Brighton Crop Protection Conference-Pest and Diseases 3C, 233-240.
- ELAD, Y., KIRSHNER, B., & Y. GOTLIB (1993): Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and postharvest treatments with biological and chemical agents. *Crop Protect.* 12, 69-73.
- PERSSON, Y., VEENHUIS, M. & NORDBRING-HERTZ. (1985): Morphogenesis and significance of hyphal coiling by nematode-trapping fungi in micoparasitic relationships. *Microbiol. Ecol.* 31: 283-291.
- PETER, B, JAMES, A, WONG, L. (1991): The Effect of Chemical Pesticides on the Infection of Sclerotia of *Sclerotinia minor* by the Biocontrol Agent *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology*:81: 1340-1343.
- PHILIPP, W-D. (1986): Chancen und Risiken mikrobieller Pflanzenschutzpräparate. *Bundesanstalt* 236: 8-17.



- PIETERSE, CMJ, VAN WEES SCM, HOFFLAND E, VAN PELT JA., & VAN LONN LC. (1996): Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237.
- POPPE, J., & WELVAERT, G. DE BOTH (1985): Diseases and their control-possibilities after ten years *Pleurotus* culture in Belgium. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv Gent* 50, 1097-1108.
- PORTER, D. M. (1980): Increased severity of *Sclerotinia* blight in peanuts treated with captafol and chlorotalonil. *Pl. Dis.* 64: 394-395.
- PRELL, H.H. (1996): Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, 39-46, 181-185. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 1996.
- PUNJA, Z. K. & GROGAN, R. G. (1984): Mycelial growth and infection without a food base by eruptively germinating sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 71: 1099-1103.
- PUNJA Z. K. (1985): The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 23: 97-127.
- PUNYA, Z.K. (1988): *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, a Pathogen of many Plant species. *Advances in Plant Pathologie* 6, 523-533.
- PUNJA, Z. K., & J. E. RAHE, *Sclerotium*. Centre for Pest Management. Simon Fraser University, Canada. 166-170.
- PUNJA, Z. K. & GROGAN, R. G. (1983): Effects of inorganic salts, carbonate-bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 72: 635-639.
- PUNJA, Z.K., HUANG, J.-S. & JENKINGS, S. F. (1985): Relationship of micelial growth and produktion of oxalic acid and cell-wall degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7, 109-216.
- PUNYA; Z. & JENKIS, F. (1984): Influence of Temperature, Moisture, Modified Gaseous Atmosphere, and Depth in Soil on Eruptive Sclerotial Germination of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology* 74: 749-754.
- PUNJA, Z., JENKINGS, S. & GROGAN, R. (1984): Effect of Volatile Compounds, Nutrients, and Source of Sclerotia on Eruptive Sclerotial Germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 74: 1290-1295.
- PUNJA, Z., SMITH, V. & JENKINS, S. (1984): Relationship of disease incidence to inoculum density in *Sclerotium rolfsii* root rot of processing carrots. *Phytopathology* 74:813.
- PUNJA, Z., CARTER, J., CAMPBELL, G. & ROSSEL, E. (1986): Effects of calcium and nitrogen fertilizers, fungicides, and tillage practices on incidence of *Sclerotium rolfsii* on processing carrots. *Plant Disease* 70:819-834.

- PURKAYASTHA, R.P. (1998): Disease resistance and induced immunity in plants. *Ind. Phytopath.* 51, 3: 211-221.
- RAPOSO et al. 1996: Distribution and fitness of Isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Pl. Pathol.* 45, 497-505.
- REESE, E.T. & MANDELS, M.: Enzymatic hydrolysis of  $\beta$ -glucans. *Advances in Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Related Material*, 197-234, Oxford, Pergamon. 1963.
- REUVENI, R., DOR, GENIA., RAVIV, M., REUVENI, M. & TUZUN, S. (2000): Systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics systems, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protect.* 19: 355-361.
- REWAL, N., COLEY-SMITH, J. & SEALY-LEWIS, H. (1991): Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*.
- RICHARDSON, L.T. (1954): The persistence of thiram in soil and its relationship to the microbiological balance and damping-off control. *Can. J. Bot.* 32: 335-346.
- RIFAI, M.A. (1969): A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers* 116: 1-56.
- RIFAI, M.A. & WEBSTER, J. (1966): Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. II. *H. aureoviridis* and *H. rufa* f. *steriles* f. nov. *Trans. Br. mycol. Soc.* 49: 289-296.
- ROSS, A.F. (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 329-363 zitiert in SPLETZER & ENYEDI, 1999.
- RUPPEL, E. G., BAKER, R., HARMAN, J., HUBBARD, J. P., HECKER, R. J., & CHET, I. (1983): Field test of *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. as a biocontrol agent of seedling disease in several crops and *Rhizoctonia* root of sugar beet. *Crop Protect.* 2: 399-408.
- RYAN, C.A. (1990): Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425-429. In STICHER, L., MAUCH-MANI, B. MÉTRAUX, J.P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- SAHAL, A.S. & MANOCHA, M.S. (1993): Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 317-338.
- SALOHEIMO, M., LEHTOVAARA, P., PENTTILÄ, M., TEERI, T.T., STAHLBERG, J., JOHANSSON, G., PETTERSSON, G., CLAEYSSSENS, M., TOMME, P. & KNOWLES, J. (1988): A new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene* 63: 103-112.
- SAMUELS, G.J., PETRINI, O. & MANGUIN, S. (1994): Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* 86: 421-435.

- SAMUELS, G. J. (1996): *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100:923-935.
- SHAHIDI, A. & SCHLÖSSER, E. (1983): Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung von *Rhizoctonia solani* an Rasengräsern mit *Trichoderma harzianum* Rifai. Z. Vegetationstechnik 6: 139-142.
- SCHINNER, F. & SONNLEITNER, R.: Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik (III), Pflanzenschutzmittel, Agrarhilfsstoffe und organische Umweltchemikalien, 68-71. Springer, 1997.
- SCHLÖSSER, E.: Allgemeine Phytopathologie. Erste Auflage, 30, 53-78, Thieme, Stuttgart, 1983.
- SCHLÖSSER, E. (1988): Fungal strains with reduced sensitivity to fungicides. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 53: 557-559.
- SCHLÖSSER, E.: Allgemeine Phytopathologie. Zweite neuebearbeitete Auflage, 61, 78, 191, 224, 260-314, Thieme, Stuttgart, 1997.
- SCHWANTES, H.O. (1996): Biologie der Pilze: Eine Einführung in der angewandte Mykologie. Ulmer Verlag. S. 25-26, 110.
- SHEW, B., M. BEUTE, (1983): Effects of crop management on the epidemiology of southern rot of peanut. Phytopathology 74: 530-535.
- SHEW, B., BEUTE, M., & C. CAMPBELL, 1984: Spatial Pattern of Southern Stem Rot Caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc., in Six North Carolina Peanuts Fields. Phytopathology 74: 730-735.
- SHEW, B., BEUTE, M. & WYNNE, C. (1987): Field, Microplot, and Greenhouse Evaluations of Resistance to *Sclerotium rolfsii* in Peanut. Plant Dis. 71:188-191.
- SHUKLA, D.D. & MISHRA, A. (1970): Effects of salts on growth of *Trichoderma viride*. Friesia 9: 299-301. In PAPAIVAS, G. (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. Phytopathology 23: 23-54.
- SIEGRIST, J., GLENEWINKEL, D., KOLLE, C. & SCHMIDTKE, M. (1997): Chemisch induzierte Resistenz bei Buschbohnen gegenüber bakteriellen und pilzlichen Schaderregern. Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. Z. PflKrankh. PflSchutz. 104: 599-610.
- SIVAN., ELAD, Y., & CHET, I. (1984): Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 74: 498-501.
- SCHIRMBÖCK, M., LORITO, M., HAYES, C.K., ARISAN-ATAC, I., SCLA, F., HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (1994): Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. App. Env. Microbiol. 60: 4364-4370.

- SMITH, J.E., BERRY, D.R. & KRISTIANSEN, B.: Fungal Biotechnology, S. 308, Academic Press, London, 1980.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B. MÉTRAUX, J.P. (1997): Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 235-270.
- STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S & KAUFFMANN, S. (1993): Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. Biochemie 75: 687-706.
- STRASHNOV, Y., ELAD, Y., SIVAN, A., & I. CHET (1985): Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. Pl. Pathol. 34:14-151.
- STRASHNOV, Y., ELAD, Y., SIVAN, A., RUDICH, Y., & CHET, I. (1985): Control of *Rhizoctonia solani* fruit rot of tomatoes by *Trichoderma harzianum* Rifai. Crop Protect. 4: 359-364.
- SIVAN, A. & CHET, I. (1993): Integrated control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. Crop Prot. 12:380-386.
- SIVAN, A., ELAD, Y. & CHET, I. ( 1984): Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 74: 498-501.
- SIVAN, A & CHET, I. (1989): Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol. 135: 675-682.
- SPANU, P. & BONAFANTE-FASOLO, P. (1988): Cell wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. New. Phytol. 109: 119-124.
- SPLETZER, M. & ENYEDI, J. (1999): Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology 89:722-727.
- STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEMANN-MERDINOGLU, S. & KAUFFMANN, S. (1993): Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. Biochemie 75:687-706.
- SUMMER D. R.: Compendium of Bean Diseases. Second Edition, 13-14, The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, 1991.
- TAYLOR, A.G. & DICKSON, M.H. (1987): Seed coat permeability in semi-hard snap bean seeds: Its influence on imbibitional chilling injury. J. Hortic. Sci. 62: 183-189.
- TAYLOR, A.G. & HARMAN, G.E. (1990): Concepts and technologies of selected seed treatments. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 321-339.
- TAYLOR, A. G., MIN, T. G., HARMAN, G. E., & JIN, X. (1991): Liquid coating Formulation for the application of biological seed treatments of *Trichoderma harzianum*.
- TEERI, T.T., SALOVUORI, I. & KNWOLES, J. (1983): The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. Bio-Technologies 1: 696-699.

- THORNTON, C.R., DEWEY, F.M. & GILLIGAN, C.A. (1994): Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of live propagules of *Trichoderma harzianum* in a peat-bran medium. *Soil Biol. Biochem.* 26: 909-920.
- TOMASINO, S.F. (1987): Spatial pattern, inoculum density-disease incidence relationship and population dynamics of *Sclerotium rolfsii* on apple roostock. *Pl. Dis.* 71: 719-724.
- TOKIMOTO, K. (1986): Physiological studies on antagonism between *Lentinus edodes* and *Trichoderma* spp. in bedlogs of the former. Rept. Tottori Mycol. Inst., Japan, 23: 1-54. In KÖHL, J. (1989): Eignung von Stämmen aus der Gattung *Trichoderma* für die biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze. Diss. Giessen, 1989.
- TREUTTER, D. (2000): Induzierte resistenz in der Phytomedizin, Konsequenzen für die Nahrungsqualität? *Journal of Appl. Bot.* 74: 1-4.
- TRILLAS, M.I., COTXARRERA, L., CASANOVA, E. & CORTADELLAS, N. (2000): Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Pathology*, 56: 107-116.
- TRONSMO, A. & DENNIS, C. (1977): The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Neth. J. Path.* 83 (1): 449-455.
- TRONSMO, A. (1991): Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control* 1: 59-62.
- TU, J. (1980): *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 70:670-674.
- VAN ARSDELL, J.N., KWOK, S., SCHWEICKART, V.L., LADNER, M.B., GELFAND, D.H. & INNIS, M.A. (1987): Cloning characterization, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio-Technology* 5: 60-64.
- VANNACI, G., PECCHIA, S., MALLEGNI, C., CORTELLINI, W. & FACCINI, F. (1991): Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* lettuce drop. *Petria* 1: 140-141.
- VAN LOON, L.C., PIERPOINT, W.S., BOLLER, T. & CONEJERO, V. (1994): Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 245-264.
- VAN LONN L.C., BAKKER, H.M. & PETERSI, C.M.J. (2000): Systemic resistance induced by Rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- VAN PEER, R., NIEMANN, G.J. & SCHIPPERS, B. (1991): Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* spp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81:728-734.
- VIJAYA PALANI, P., & D. LALITHAKUMARI (1999): Inhibition of *Venturia inaequalis* by genetically improved *Trichoderma longibrachiatum* strains. *J. Pl. Dis. Protect.* 106: 460-465.

- VLOUTOGLOU, I. & KALOGERAKIS, S.N. (2000): Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. *Pl. Pathol.* 49: 339-345.
- VOET, D. & VOET, J.G.: *Biochemie*. VCH-Verlag. S. 240-251, Weinheim, New York, Basel, Cambridge 1993.
- WARD, E.W.B.: *Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi: Biology and molecular biology of plant-pathogens interactions*. S. 107-131, Springer Verlag, 1986.
- WARD, E.R., UKNES, S.C., WILLIAMS, S.C. & DINCHER, S.S. (1991): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094.
- WARDLE, D.A., PARKINSON, D. & WALLER, J.E. (1993): Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* 94: 165-172.
- WEBSTER, J.: *Introduction to Fungi*. Second Edition, S. 59-60, 230-232, 260, 1983.
- WELLS, H.D., BELL, D.K. & JAWORSKI C.A. (1971): Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62: 442-447.
- WEINDLING, R. (1934): Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24: 1153-1179.
- WERNER, D.: *Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen*. S. 13-14, 19, 21, 23, 61, 187, Thieme Verlag, Stuttgart, 1987.
- WHILHITE, S.E., LUMSDEN, R.D. & STRANEY, D.C. (1994): Multinational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungal *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Phythium* damping-off. *Phytopathology* 84: 816-821.
- WHIPPS, J.M., LEWIS, K. & COOKE, R.C.: Mycoparasitism and plant disease control. S. 161-187. In *Fungi in biological control systems*. Edited by M.N. Burge. St. Martin's Press, Manchester, 1988.
- WOLF, G., KEMPF, H. J. & FLIEßBACH, A. (1986): Untersuchung zur antagonistischen Wirkung von *Trichoderma* spp. und *Erwinia* spp. *Biologische Bundesanstalt* 232: 279.
- WOLOSHUK, C.P., MEULENHOF, J.S., SELA-BUURLAGE, M., VAN DEN ELZEN, P.J.M. & CORNELISSEN, B.J.C. (1991): Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3:619-628.
- YEDIDIA, I., BENHAMOU, N. & CHET, I. (1998): Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061-1070.

- YEDIDIA, L., BENHAUMOU, N. & R. BAKER (1999): Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) in the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 929-935.
- YODER, O.C. (1980): Toxins in pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 103-129.
- YOSHIKAWA, M., TSUDA, M. & TAKEUCHI, Y. (1993): Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* 80:417-420.
- ZAMIR, D. & CHET, I (1985): Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 31: 578-580.
- ZEIDAN, O. (1985): Integrating Onion in Crop Rotation to Control *Sclerotium rolfsii*. *Pl. Dis.* 70: 426-428.

## 9 ANHANG

**Tabelle A1: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolsii* (Cr1 und Cr2) gegen Carbendazim**

PILZE	Wirkung von Carbendazim µg a.i. /ml nach 4 Tagen					
	0	0,5	1,5	2,5	5	25
<b>T-040</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-093</b>	(+)	(*)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-165</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-257</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>Cr1</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>Cr2</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)

**Tabelle A2: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolsii* (Cr1 und Cr2) gegen Tebuconazol**

PILZE	Wirkung von Tebuconazol µg a.i. /ml nach 4 Tagen				
	0	0,5	5	25	100
<b>T-040</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-093</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-165</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-257</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(*)	(-)	(-)
<b>Cr1</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Cr2</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) Starkes Wachstum  
 (\*) Schwache Wachstumshemmung  
 (-) Starke Wachstumshemmung



**Tabelle A3: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolsii* (Cr1 und Cr2) gegen Metalaxyl**

PILZE	Wirkung von Metalaxil µg a.i. /ml nach 4 Tagen				
	0	0,5	5	25	100
<b>T-040</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-093</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-165</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-257</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Cr1</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Cr2</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

**Tabelle A4: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolsii* (Cr1 und Cr2) gegen Mancozeb**

PILZE	Wirkung von Mancozeb µg a.i. /ml nach 4 Tagen				
	0	0,5	5	25	100
<b>T-040</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-093</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-165</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-257</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>Cr1</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Cr2</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+)    **Starkes Wachstum**  
 (\*)    **Schwache Wachstumshehmung**  
 (-)    **Starke Wachstumshehmung**

**Tabelle A5: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolfii* (Cr1 und Cr2) gegen Bitertanol**

PILZE	Wirkung von Bitertanol µg a.i. /ml nach 4 Tagen				
	0	5	20	50	100
<b>T-040</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-165</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-257</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-12j</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>T-029</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-047</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>11T-115</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-126</b>	(+)	(*)	(*)	(-)	(-)
<b>T-134</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>T-190</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-192</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-218</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-226</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>T-236</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>T-250</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-390</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)

(+) **Starkes Wachstum**  
 (\*) **Schwache Wachstumshehmung**  
 (-) **Starke Wachstumshehmung**

**Tabelle A6: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen und *C. rolsii* (Cr1 und Cr2) gegen Carbendazim**

<b>PILZE</b>	<b>Wirkung von Carbendazim µg a.i. /ml nach 4 Tagen (Derosal)</b>				
	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>T-040</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-165</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-257</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(*)
<b>T-12j</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-029</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-047</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-115</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-126</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-134</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-190</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-192</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-218</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-226</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-236</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-250</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-390</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) **Starkes Wachstum**  
 (\*) **Schwache Wachstumshemmung**  
 (-) **Starke Wachstumshemmung**

**Tabelle A7: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen gegen Triforin**

<b>PILZE</b>	<b>Wirkung von Triforin µg a.i./ml nach 4 Tagen (Saprol)</b>				
	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>100</b>
<b>T-040</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>T-165</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-257</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-12j</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-029</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-047</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-115</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-126</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(-)
<b>T-134</b>	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
<b>T-190</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-192</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(*)
<b>T-218</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-226</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)
<b>T-236</b>	(+)	(+)	(*)	(*)	(-)
<b>T-250</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-390</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(*)

(+) **Starkes Wachstum**  
 (\*) **Schwache Wachstumshemmung**  
 (-) **Starke Wachstumshemmung**

**Tabelle A8: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen gegen Prochloraz**

<b>PILZE</b>	<b>Wirkung von Prochloraz µg a.i. /ml nach 4 Tagen</b>				
	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>T-040</b>	(+)	(*)	(-)	(-)	(-)
<b>T-165</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-257</b>	(+)	(*)	(-)	(-)	(-)
<b>T-391</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-12j</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-029</b>	(+)	(+)	(*)	(-)	(-)
<b>T-047</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-115</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-126</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-134</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-190</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-192</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-218</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-226</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-236</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-250</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-390</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) **Starkes Wachstum**  
 (\*) **Schwache Wachstumshehmung**  
 (-) **Starke Wachstumshehmung**

**Tabelle A9: Fungizidempfindlichkeit von *Trichoderma*-Stämmen gegen Benomyl**

<b>PILZE</b>	<b>Wirkung von Benomyl µg a.i. /ml nach 4 Tagen</b>				
	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>100</b>
<b>T-040</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-165</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-257</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-391</b>	(+)	(+)	(+)	(*)	(-)
<b>T-12j</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-029</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-047</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-115</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-126</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-134</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-190</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-192</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-218</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-226</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-236</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-250</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>T-390</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) **Starkes Wachstum**  
 (\*) **Schwache Wachstumshehmung**  
 (-) **Starke Wachstumshehmung**

**Tabelle A10. Wirkung verschiedener Fungizide auf das Wachstum von *Trichoderma* spp. bei 20 µg a.i. /ml nach 4 Tagen**

<b>Pilze</b>	<b>Saprol</b> (19% Triforin)	<b>Derosal</b> (59,4% Carbendazim)	<b>Baycor</b> (25% Bitertanol)	<b>Sportak</b> (40% Prochloraz)	<b>Benomyl</b> (50% Benomyl)
<b>T-12j</b>	(+)	-	+	-	-
<b>T-029</b>	(+)	-	(+)	(-)	-
<b>T-040</b>	(+)	-	+	(-)	-
<b>T-047</b>	(+)	-	-	(+)	-
<b>T-115</b>	+	-	+	-	-
<b>T-126</b>	+	-	(-)	-	-
<b>T-134</b>	(+)	-	+	(-)	-
<b>T-165</b>	+	-	(-)	-	-
<b>T-190</b>	(+)	-	+	-	-
<b>T-192</b>	(+)	-	+	(-)	-
<b>T-218</b>	+	-	+	(-)	-)
<b>T-226</b>	+	-	+	-	-
<b>T-236</b>	+	-	(-)	-	-
<b>T-250</b>	(+)	-)	+	-	-
<b>T-257</b>	+	-	+	(-)	-
<b>T-390</b>	(+)	-	+	-	-
<b>T-391</b>	+	+	+	-	+

(+) **Starkes Wachstum**  
 + **Schwache Wachstumshemmung**  
 (-) **Starke Wachstumshemmung**  
 - **Kein Wachstum**

**Tabelle A11. Wirkung verschiedener Fungizide auf das Wachstum phytopathogener Erreger bei 20 µg a.i. /ml nach 4 Tagen**

<b>Pilze</b>	<b>Saprol</b> (19% Triforine)	<b>Derosal</b> (59,4% Carbendazin)	<b>Baycor</b> (25% Bitertanol)	<b>Sportak</b> (40% Prochloraz)	<b>Benomyl</b> (50% Benomyl)
<i>C. rolfsii</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>B. cinerea</i>	(+)	-	(-)	-	-
<i>P. debaryanum</i>	(+)	-	+	(-)	-
<i>F. culmorum</i>	-	-	+	-	-
<i>F. oxysporum</i>	(+)	-	+	-	-
<i>F. gramineum</i>	+	-	(+)	-	-
<i>P. betae</i>	(-)	-	-	-	-
<i>Alternaria spp.</i>	(+)	(+)	(+)	+	(+)
<i>Colletothricum spp</i>	+	-	(-)	-	-
<i>R. solani</i>	(+)	-	(+)	(-)	(+)
<i>P. mali</i>	+	-	-	-	-

(+) **Starkes Wachstum**  
 + **Schwache Wachstumsheimmung**  
 (-) **Starke Wachstumsheimmung**  
 - **Kein Wachstum**



**Tabelle A12: Antagonistisches Potential von *Trichoderma* spp. gegen verschiedene Pilze in Dualkultur**

	ohne Hemmzone	mit Hemmzone	überwachsen
(**) T-391-Pd <sub>330</sub>	+		+
(*) T-391-Pu <sub>328</sub>	+		+
(*) T-391-Rs <sub>194</sub>	+		+
(**) T-391-Fox <sub>200</sub>	+		+
(*) T-391-Fc <sub>207</sub>	+		+
(**) T-093-Ss	+		+
(*) T-093-Fc <sub>207</sub>	+		+
(**) T-093-Fox <sub>200</sub>	+		+
(*) T-093-Rs <sub>194</sub>	+		+
(**) T-165-Ss	+		+
(**) T-165-Pd <sub>330</sub>	+		+
(**) T-165-Rs <sub>194</sub>	+		+
(**) T-165-Fc <sub>207</sub>	+		+
(**) T-257-Ss	+		+
(**) T-257-Fox <sub>200</sub>	+		+
(*) T-257-Pd <sub>330</sub>	+		+
(*) T-257-Rs <sub>194</sub>	+		+
(*) T-257-Fc <sub>207</sub>	+		+
(**) T-040-Ss	+		+
(**) T-040-Pu <sub>328</sub>	+		+
(**) T-040-Rs <sub>194</sub>	+		+
(**) T-040-Fox <sub>200</sub>	+		+

(\*) Erreger wird zum Teil überwachsen

(\*\*) Starker Antagonismus (Erreger wird vollständig überwachsen)

(T-391) *Trichoderma harzianum* Rifai.(T-093) *Trichoderma hamatum* Bon.(T-165) *Trichoderma koningii* Oud.(T-257) *Trichoderma harzianum* Rifai.(T-040) *Trichoderma harzianum* Rifai.(Ss) *Sclerotinia sclerotiorum* Lib de B.(Pu) *Pythium ultimum* Trow.(Pd) *Pythium debaryanum* Drechsler.(Rs) *Rhizoctonia solani* Kühn.(Fc) *Fusarium culmorum*(Fox) *Fusarium oxysporum* (Schlecht).

**Tabelle A13: Wachstum von *Trichoderma* spp. und *C. rolfsii* auf Hirsepulver (g/l) nach drei Tage**

Medien	Pilze	Farbe Myzel	Farbe Sporulation	Wachstum
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-040	cream cream gelblich cream-gelblich	grün dunkel-grün grün-weiß grün-weiß	- + + (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-190	weiß weiß weiß weiß	grün grün grün-gelb grün-blau	- - (+) (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-126	weiß weiß cream cream	grün grün-weiß grün-gelblich grün	- + + (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-134	weiß weiß cream cream	cream cream-grün cream-grün cream-grün	- - (+) (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-226	weiß weiß weiß-cream cream	grün dunkel-grün grün grün-weiß	- + (+) (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-12j	weiß-cream weiß-cream cream cream	grün-weiß-gelblich grün-blau-gelblich grün-gelblich-weiß grün-weiß	- + + (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-192	weiß weiß cream cream	cream cream grün grün	- + (+) (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-236	weiß weiß cream cream	keine keine grün grün	- - (+) (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-029	weiß-cream weiß-cream weiß-cream weiß-cream	cream cream weiß weiß	- - (+) (+)
Hp - 5g Hp - 10g Hp - 20g Hp - 40g	T-218	weiß weiß cream cream	grün-gelb grün-gelb grün-weiß-gelb grün-weiß-gelb	- + (+) (+)

Hp - 5g	T-257	weiß	grün-weiß	-
Hp - 10g		weiß	grün-weiß	+
Hp - 20g		weiß	grün-weiß	(+)
Hp - 40g		weiß	dunkel-grün	(+)
Hp - 5g	T-250	weiß	grün	-
Hp - 10g		cream	grün-cream	(+)
Hp - 20g		cream	dunkel-grün	(+)
Hp - 40g		cream	cream-dunkel-grün	(+)
Hp - 5g	T-115	weiß	cream	+
Hp - 10g		weiß	cream	+
Hp - 20g		cream	dunkel-grün	(+)
Hp - 40g		cream	dunkel-grün	(+)
Hp - 5g	T-047	weiß	cream	+
Hp - 10g		cream	cream	+
Hp - 20g		cream	cream	(+)
Hp - 40g		cream	cream	(+)
Hp - 5g	T-390	cream	grün	-
Hp - 10g		cream	grün	(+)
Hp - 20g		cream	grün-weiß	(+)
Hp - 40g		cream	grün-weiß	(+)
Hp - 5g	Cr2	weiß	keine	-
Hp - 10g		weiß	keine	(+)
Hp - 20g		weiß	keine	(+)
Hp - 40g		weiß	keine	(+)

(Hp)    **Hirsemehl**  
 -        **mittelmäßiges Wachstum**  
 +        **starkes Wachstum**  
 (+)     **sehr starkes Wachstum**

**Tabelle A14: Antagonistische Verhalten von *Trichoderma*-Stämme gegen *C. rolsii* (Cr2) auf MPA.  
 Inokulationszeit beider Pilze an gleichen Tag**

Pilze	<i>Trichoderma</i> überwächst	<i>C. rolsii</i> überwächst
T-192 – Cr <sub>2</sub>	(+)*	
T-047 – Cr <sub>2</sub>	(+)*	
T-215 – Cr <sub>2</sub>		(+)*
T-236 – Cr <sub>2</sub>	(-)	
T-029 – Cr <sub>2</sub>	(+)*	
T-218 – Cr <sub>2</sub>		(+)*
T-134 – Cr <sub>2</sub>		(+)*
T-115 – Cr <sub>2</sub>	(+)*	
T-192 – Cr <sub>2</sub>	(+)*	

(+)\*    **Der Pilz ist aggressiv und überwächst.**  
 (-)    **Keine überwächst**

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. Schlösser für die Betreuung und Überlassung des Themas und für die Freiheit und das Vertrauen bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Für seine Mühe und Motivation, trotz Gesundheitsproblemen zum Gelingen und Ende dieser Arbeit beizutragen hat, herzlichen Dank.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Friedt danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates und Empfehlungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. ret. nat. H. Hindorff, AOR des Institutes für Pflanzenkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für die Vorkorrektur dieses Manuskripts. Ebenfalls mein besonderen Dank für Juan Carlos Barrientos der Universität Bonn für seine Hilfe beim Druck der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr Ursula Richter vom Institut für Botanik und Pflanzenphysiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen für ihre Hilfe bei der Vorbereitung der Proben für das Rasterelektronenmikroskop und Herrn Dr. M. Hollenhorst vom Hochschulrechenzentrum für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich für die freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit, besonders Frau. Elke Stein, Susanne Habermehl, Christel Zörb, Düringer Martina, Brigitte Fortnagel, Irene Reh, Monica Osnaya, Ursula, Packzad, Bernd Steinhauer, Georg Willems, Jannis Aspromougos, Bonny Soekarno und Ahmad Mouhanna.

Bei Frau Christel Nickel-Demuth und Herrn Dieter Bork bedanke ich mich für die Hilfe zur Durchführung der Versuche.

Auch dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), der mich im Rahmen eines Praktikums mit einem Stipendium unterstützte, danke ich herzlich.

Ebenfalls möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr. ret. nat. Frank Bernhardt und Herrn Dr. ret. nat. Michael Jung, Firma BJ Diagnostik GmbH, für seine Hilfe und Freundschaft.

Meiner Familie für ihre Unterstützung während meines Aufenthalts in Deutschland.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Frau Tanja für ihre unermüdliche Hilfe und Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit und ihr Verständnis in den schwierigen Phasen.

**Lebenslauf**

Name	Diego Falconi
Geburtsdatum	14.12.62
Geburtsort	Riobamba-Ecuador
Staatsangehörigkeit:	ekuatorianisch

**Schulbildung:**

1969 - 1975	Grundschule, Ecuador
1975 - 1983	Gymnasium, Ecuador
1983	Abitur

**Studium:**

03/1984 – 09/1989	Studium der Agrarwissenschaften, Universität ESPOCH, Riobamba, Ecuador.
10/1989 – 10/1990	Praktikum im Landwirtschaftsministerium, Riobamba, Ecuador.
09/1990	Internationale Weiterbildung über Epidemiologie und Pflanzenschutz, CATIE (Centro Agronomico- Tropical), Costa Rica. (Stipendium der Deutschen Stiftung für Internationale Entwicklung, DSE).
05/1991	Vorlage der Diplomarbeit, Thema: "Inventar, morphologische und taxonomische Aspekte, sowie geographische Verteilung der Schädlinge von ( <i>Lupinus mutabilis</i> ) und ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) in den Kantonen Riobamba und Pallatanga der Provinz Chimborazo", Ecuador. Erlangung des Titels Dipl. Agr. Ing.
05/1991 – 08/1992	Wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Entomologie und Schädlingsbekämpfung an der Universität ESPOCH, Riobamba, Ecuador.
09/1992 – 03/1993	Deutschkurs, Goethe-Institut, Mannheim.
04/1993 – 12/1995	Forschungstätigkeit am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig- Universität Giessen. Stipendium des Deutsch- Akademischen Auslandsdienstes, DAAD.
seit 10/1996	Doktorand am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Giessen.